

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

Función del gen *lines* y la familia *odd-skipped*  
en la integración de múltiples vías de  
señalización durante el desarrollo del ala de  
*Drosophila*

Elvira Benítez de Gracia

Memoria presentada por la licenciada  
ELVIRA BENÍTEZ DE GRACIA  
Para aspirar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS

Directores de esta tesis:

Dra. Isabel Guerrero Vega  
Profesor de Investigación  
Y

Dra. Isabel Rodríguez Enríquez  
Investigadora CSIC

Madrid, 2008



El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular/ Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, con la ayuda de una beca predoctoral FPI, del fondo de investigación del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC).

<b>ÍNDICE DETALLADO</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN EN INGLÉS</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>88</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>101</b>

Índice detallado

<b>ÍNDICE DETALLADO</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN EN INGLÉS</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1.- Introducción a la Biología del Desarrollo.</b>	<b>7</b>
1.1.- La importancia de la comunicación celular.	7
1.2.- <i>Drosophila melanogaster</i> , organismo modelo para estudiar el desarrollo.	8
1.2.1.- Ciclo vital.	9
1.2.2.- El disco imaginal de ala como modelo experimental.	10
<b>2.- La regulación de la expresión génica.</b>	<b>17</b>
2.1.- La regulación de la vía de Notch.	17
2.2.- La regulación de la vía de Wg.	18
<b>3.- El gen lines y la familia de genes odd-skipped.</b>	<b>20</b>
3.1.- Lines.	20
3.2.- Odd- Skipped.	21
<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>1.- Materiales y métodos genéticos e histológicos.</b>	<b>24</b>
1.1.- Estirpes de moscas utilizadas.	24
1.2.- Obtención de moscas transgénicas UAS-Bowl-VP16.	25
1.3.- Análisis clonal.	25
1.3.1.- Clones de falta de función.	25
1.3.2.- Expresión ectópica de genes usando el sistema GAL4/UAS.	26
1.3.3.- Clones de recombinación mitótica generados por la técnica MARCM.	27
1.3.4.- Expresión ectópica de genes controlada temporalmente.	28
1.4.- Inmunohistoquímica de los discos imaginales.	28
1.5.- Hibridaciones <i>in situ</i> .	29
1.6.- Preparación de las cutículas adultas.	30
1.7.- Adquisición y tratamiento de imágenes.	30
<b>2.- Materiales y Métodos Bioquímicos.</b>	<b>30</b>
2.1.- Materiales y métodos básicos de manipulación de ADN.	30
2.2.- Generación de anticuerpos.	30
2.2.1.- Generación del anticuerpo Lines.	30
2.2.2.- Generación del anticuerpo Drm.	31
2.3.- Construcción de plásmidos.	32
2.3.1.- pUAS-lines GFP.	32
2.3.2.- pUAS-bowl $\Delta$ eh-1VP16.	32
2.4.- Construcción de vectores con secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción Odd.	34
<b>3.- Materiales y métodos de cultivos celulares.</b>	<b>35</b>
3.1.- Líneas celulares.	35
3.2.- Métodos de transfección.	35

3.3.- Detección de proteínas inducidas.	36
3.3.1.- Ensayos de inmunoprecipitación.	36
3.3.2.- Análisis mediante Western Blot.	36
3.3.3.- Tinción inmunohistoquímica de células.	37
3.4.- Ensayo de Luciferasa.	37
3.4.1.- Transfección de células.	38
3.4.2.- Medida de actividad Luciferasa.	38
<b>RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>1.- Análisis funcional del gen <i>lines</i> durante el desarrollo imaginal de <i>Drosophila</i>.</b>	<b>39</b>
1.1.- Patrón de expresión del gen <i>lines</i> durante el desarrollo imaginal.	39
1.2.- Análisis clonal de la falta de función del gen <i>lines</i> .	41
1.2.1.- Fenotipo cuticular de la falta de función de <i>lines</i> en el insecto adulto.	41
1.2.2.- Análisis en el disco imaginal de ala de los efectos producidos por clones de falta de función de <i>lines</i> .	42
1.2.2.1.- Cambio de identidad en las células mutantes <i>lines</i> .	45
1.2.2.2.- Estudio de la función de <i>lines</i> en la regulación de las vías de señalización implicadas en la morfogénesis del ala.	46
1.2.2.3.- Regulación de la proliferación celular y la apoptosis por <i>lines</i> .	52
1.3.- Análisis de la ganancia de función del gen <i>lines</i> .	55
<b>2.- Estudio de los genes que median la respuesta de <i>lines</i>.</b>	<b>56</b>
2.1.- Estudio de la jerarquía funcional del casete Drm/Lines/Bowl.	56
2.1.1.- <i>lines</i> impide la acumulación de nuclear de Bowl.	57
2.1.2.- La sobreexpresión de Drumstick mimetiza la falta de <i>lines</i> .	59
2.2.- Función de las proteínas Odd-Skipped durante el desarrollo imaginal.	61
2.2.1.- Las proteínas Odd y Sob favorecen la acumulación nuclear de Bowl.	63
2.3.- Estudio de la interacción de Lines y los diferentes miembros de la familia Odd-Skipped.	63
2.3.1.- Estudios de la interacción molecular entre Lines y la familia Odd-Skipped.	64
2.3.2.- Estudio de las relaciones epistáticas de <i>lines</i> y la familia <i>odd-skipped</i> .	65
2.4.- Divergencia funcional de los genes Odd-Skipped.	67
2.4.1.- Efecto de la expresión de los genes <i>odd-skipped</i> en el disco de ala.	67
2.4.2.- Estudio funcional de los genes <i>odd-skipped</i> en le disco de pata.	68
2.4.3.- Estudio funcional de los genes <i>odd-skipped</i> en le disco de ojo-antena.	71
<b>3.- La función de <i>lines</i> como componente regulador en el mantenimiento del borde D/V.</b>	<b>73</b>
3.1.- Estudio de la función de Lines en la regulación de las respuestas mediadas por la vía de Wg.	73
3.2.- Lines media las respuestas sinérgicas entre las señales de N y Wg durante el mantenimiento del borde D/V del disco de ala.	74
3.3.- La activación de Notch requiere el reclutamiento de Gro por Bowl.	78
3.3.1.- Hairless, normaliza los efectos de Lines/Bowl en la	

activación de Notch.	80
3.4.- La represión de las dianas de la vía de Wg implica la cooperación de Gro y Bowl.	82
3.5.- Lines se requiere como un factor modular en los complejos transcripcionales que regulan las vías de Notch y de Wg.	85
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>88</b>
1.- <i>lines</i> se requiere durante el desarrollo imaginal.	88
2.- <i>lines</i> tiene una función dinámica en el desarrollo imaginal del ala.	88
3.- <i>lines</i> es necesario para la especificación de territorios dentro del disco de ala.	89
4.- <i>lines</i> regula la proliferación celular y la apoptosis.	91
5.- <i>lines</i> regula el mantenimiento de borde D/V modulando la actividad de las vías de Wg y Notch.	91
6.- La función reguladora de la red génica Drm/Lines/Bowl.	92
7.- Mecanismo de regulación de los niveles de proteína Bowl.	93
8.- Divergencia funcional entre las proteínas de la familia Odd-Skipped.	94
9.- Gro y Hairless están implicados en el entrecruzamiento de las vía afectadas por falta de función de <i>lines</i> .	95
10.- Función de <i>lines</i> en los discos imaginales ventrales.	97
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>101</b>

Resumen en Inglés

This thesis aim to investigate the *lines* function during the imaginal wing disc development. It was found that *lines* mutant cells induce an aberrant responses to key signaling pathways: Notch (N), Wingless (Wg), JAK/STAT, Decapentaplegic (Dpp) and EGFR, which yield changes in the proximal-distal cell identity and a cell dramatic overgrowth.

A regulatory network involving Lines/Drumstick/Bowl is implicated in the integration of patterning information at several stages during the development. It was shown that the same cassette is important in integrating several different signaling events in the developing wing. Moreover, two additional members of the odd-skipped family were included to this regulatory network, *odd* and *sob*. Dm, Odd and Sob inhibit Lines functions allowing Bowl nuclear accumulation. Dm controls nuclear Lines levels, Lines turns down the steady-state accumulation of Bowl protein in the wing disc. Odd and Sob fail in Lines relocalization to the cytoplasm but their ability to interact with Bowl suggests that the formation of a protein complex would inhibit Lines function. Genetic experiments show that Bowl is the primary effector of this regulatory network.

In this generic network Dm/Lines/Bowl, *lines* is implicated in the wing development by limiting Bowl expression to the peripodial cells. A genetic interaction between Lines/Bowl and Groucho, a general co-repressor of N, Wg, EGFR, and Dpp pathways it was found. It is proposed that Lines is a modular factor of transcriptional complexes that integrates the response to different signaling pathways to control patterning and growth during development.



## Abreviaturas y Acrónimos



A	Anterior	<i>hop</i>	<i>hopscotch</i>
A/P	Antero-Posterior	HS	Heat Shock
aa	aminoácidos	<i>hth</i>	<i>homothorax</i>
<i>abd-B</i>	<i>abdominal-B</i>	IH	Inmuno Histoquímica
ADN	Ácido desoxirribonucleico	IP	Inmuno Precipitación
<i>ap</i>	<i>apterous</i>	JAK-STAT	Janus Kinase – Signal transduction and Activator of Transcription
<i>arm</i>	<i>armadillo/β-catenina</i>	JNK	Jun N-terminal Kinase
ARN	Ácido ribonucleico	kb	kilobase
ARNi	Ácido ribonucleico interferente	kD	kilodalton
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	<i>kek</i>	<i>kekkon</i>
<i>bab</i>	<i>bric-à-brac</i>	<i>lin</i>	<i>lines</i>
BDGP	Berkeley Drosophila Genome Project	MP	membrana peripodial
β-gal	β-Galactosidasa	<i>man</i>	<i>mastermind</i>
BMP	Bone Morphogenic Proteins	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
<i>bowl</i>	<i>brother of odd with entrails limited</i>	MARCM	Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker
<i>brk</i>	<i>brinker</i>	min	minutos
BSA	Albúmina de suero bovino	<i>N</i>	<i>Notch</i>
<i>ci</i>	<i>cubitus interruptus</i>	NICD	Notch IntraCellular Domain
<i>C-iro</i>	<i>complejo iroquois</i>	<i>nub</i>	<i>nubbin</i>
<i>ct</i>	<i>cut</i>	OBS	Odd Binding Site
CtBP	Carboxi terminal Binding Protein	<i>odd</i>	<i>odd-skipped</i>
<i>Cyo</i>	<i>Curly of Oster</i>	<i>omb</i>	<i>optomotor-blind</i>
D	Dorsal	ORS	Odd Related Sequences
D/V	Dorso-Ventral	P	Posterior
<i>dad</i>	<i>daughter against dpp</i>	P/D	Próximo-Distal
DEH	Después de la Eclosión del Huevo	pb	pares de bases
<i>dl</i>	<i>delta</i>	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>dome</i>	<i>domeless</i>	PDF	Perdida De Función
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>	PFA	Paraformaldehído
<i>drm</i>	<i>drumstick</i>	<i>puc</i>	<i>puckered</i>
EGF-R	Epidermal Growth Factor Receptor	R	Reverse
eh-1	engrailed homology-1	S2	Schneider 2
<i>en</i>	<i>engrailed</i>	<i>sal</i>	<i>spalt</i>
<i>f</i>	<i>forked</i>	SDS	Sulfato Sódico de Dodecilo
F	Forward	<i>ser</i>	<i>serrate</i>
Flp	Flipasa recombinasa	<i>sob</i>	<i>sister of odd and bowl</i>
<i>fng</i>	<i>fringe</i>	<i>su(H)</i>	<i>supressor of Hairless</i>
FRT	Flipase Recombination Target	TBS	Tampon Tris Salino
GDF	Ganancia De Función	Tcf / LEF	T-cell factor / Lymphoid Enhancer Factor
GFP	Green Fluorence Protein	TGF-β	Factor Transformante del Crecimiento-β
<i>gro / TLE</i>	<i>groucho / transducin like enhancer of split</i>	ts	termosensible
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3β	<i>tsh</i>	<i>teashirt</i>
<i>h</i>	<i>hairless</i>		
Hh	Hedghog		

<i>tw</i>	<i>twins</i>
UAS	Upstream Activation Sequence
<i>ubx</i>	<i>ultrabithorax</i>
<i>upd</i>	<i>unpaired</i>
V	Ventral
<i>vg</i>	<i>vestigial</i>
VgQE	Vestigial Quadrane Enhancer
VP-16	Proteína del Virón 16
<i>w</i>	<i>white</i>
WB	Western Blot
<i>wg</i>	<i>wingless</i>
<i>y</i>	<i>yellow</i>
<i>zfh</i>	<i>zinc finger homology-2</i>



# Introducción

### 1.- INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO.

Una cuestión central en la Biología del Desarrollo es entender cómo a partir de un huevo fecundado, unicelular y aparentemente indiferenciado se forma un organismo multicelular adulto. El desarrollo de organismos multicelulares requiere de la coordinación en el espacio y en el tiempo de tres procesos fundamentales: la proliferación, la diferenciación y la morfogénesis.

- La proliferación regulada y coordinada, ya que a partir de una única célula o cigoto, se debe generar un organismo multicelular, idéntico en forma y tamaño dentro de una especie ¿Cómo saben las células cuando deben dividirse?

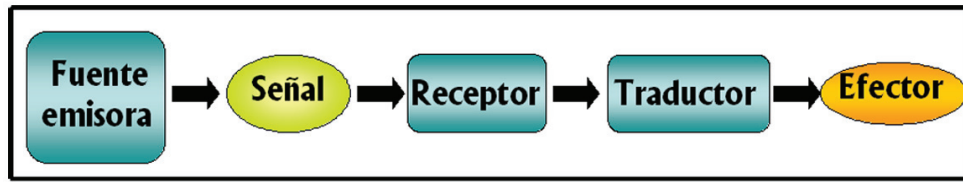
- La diferenciación celular, en cuanto que a partir de esa única célula se generan células con multitud de identidades diferentes ¿Cómo a partir de un mismo genotipo se generan tantos tipos diferentes de células?

- La morfogénesis, a través de la cual las células diferenciadas se organizan en estructuras tridimensionales dando tejidos y órganos funcionales ¿Cómo se organizan las células para formar estructuras ordenadas?

#### 1.1.- La importancia de la comunicación celular

La coordinación de los procesos indicados anteriormente está regulada genéticamente y depende del intercambio de información entre las células durante el desarrollo y de la correcta interpretación de dicha información en las células individuales. Con este propósito, los organismos multicelulares han desarrollado una amplísima gama de mecanismos de señalización. Durante el desarrollo, las células están constantemente recibiendo y procesando información que se traduce en modificaciones de la actividad genética y que gradualmente, a través de alteraciones en las propiedades de las células, definen su identidad final. Por lo tanto, un paso esencial para entender el desarrollo de un organismo es revelar cómo las células se comunican unas con otras y cómo se integra esa información para conseguir su estado funcional final.

En 1995 M. Rodbell introdujo la noción de “señal de transducción” para definir la maquinaria de comunicación celular, por como las señales del entorno afectan al comportamiento de las células (Rodbell, 1995). Este concepto de comunicación celular engloba los elementos que intervienen en cualquier medio de comunicación audiovisual, como son una fuente emisora, la señal en sí, el receptor, traductor y el efector, que en el contexto celular está asociado a una función de transducción génica (Figura I.1)



**Figura I.1.-Esquema de una vía de señalización.** En una vía de señalización intervienen varios elementos: una fuente emisora de la señal (célula); una molécula señal que puede ser una proteína difusible o presentada a la membrana de la célula receptora; el receptor que generalmente es una proteína transmembrana en la superficie de una célula; el traductor de los procesos que se desencadenan tras la unión de la molécula señal al receptor; y el efector o molécula encargada de transmitir la señal al núcleo, generando una respuesta de activación o represión génica.

Los trabajos realizados durante los últimos 20 años han establecido seis señales de transducción principales, que junto con sus efectores representan lo que se conoce como “vías de señalización”. Los componentes que forman parte de estas vías de señalización, la estructura general de la vía, así como la naturaleza molecular y especificidad de la diana efectora, están conservados a nivel evolutivo. Estas vías de señalización, que regulan la expresión génica y el comportamiento celular durante el desarrollo, se nombran en algunos casos por la molécula señal; Hedgehog (Hh), TGF- $\beta$ / Bone Morphogenic Proteins (BMP) o Wingless (Wg)/Wnt, mientras que en otros casos, deben su nombre a la molécula receptora; Notch (N), Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R), o a los mensajeros secundarios como es el caso de la vía JAK/STAT, que debe su nombre al receptor (Janus Kinasa) y al factor de transcripción STAT (*signal transduction and activator of transcription*), encargado de transmitir la señal en el núcleo.

A pesar de que estas vías de señalización, han sido ampliamente estudiadas, aún quedan muchas incógnitas acerca de cómo una célula es capaz de coordinar e interpretar simultáneamente varias señales, para determinar su identidad final durante el desarrollo de una estructura multicelular. Estos procesos están, en gran medida, determinados genéticamente y muchos de sus interrogantes se han descifrado gracias a los estudios realizados en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*.

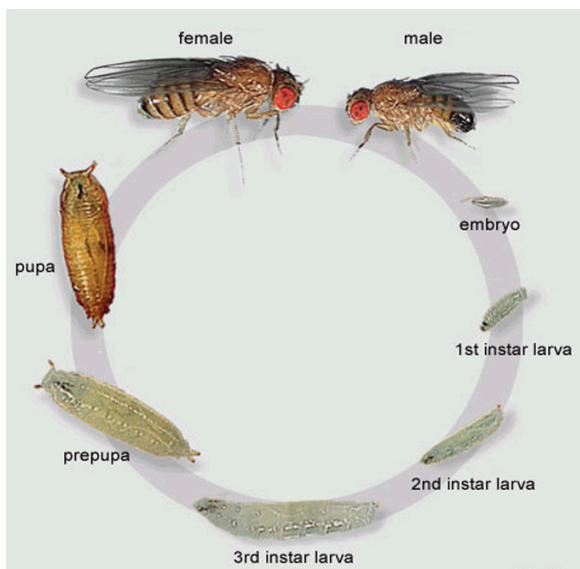
## 1.2.- *Drosophila melanogaster*, organismo modelo para estudiar el desarrollo.

*Drosophila* es un organismo modelo conveniente para el estudio de la genética del desarrollo por varias razones: tiene un ciclo de vida corto en el que produce una elevada descendencia, es fácil de mantener y el conocimiento de su genética está muy avanzado, incluida la secuenciación de su genoma. Pero sin duda, la principal ventaja es que la mayoría de los genes claves para su morfogénesis están conservados evolutivamente; el 50% de las secuencias proteínicas de la mosca corresponden a proteínas homólogas en los mamíferos, lo que ha permitido avanzar en el estudio molecular de muchas de las vías de señalización

implicadas en el desarrollo de los mismos. Además, aproximadamente el 60% de los genes implicados en enfermedades humanas tienen un homólogo identificable en el genoma de *Drosophila*, lo que hace de este organismo un sistema modelo óptimo para el estudio de las mismas.

## 1.2.1- Ciclo vital

*Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo, con metamorfosis completa, cuyo ciclo biológico se divide en cuatro estadios: embrión, larva, pupa y adulto o imago. Como los insectos son organismos poiquiloterms (no mantienen su temperatura corporal constante), la duración de su ciclo vital depende de la temperatura. A 25°C, el ciclo vital de *Drosophila* tiene una duración de 9 días, contados desde la puesta del huevo hasta la eclosión del adulto.

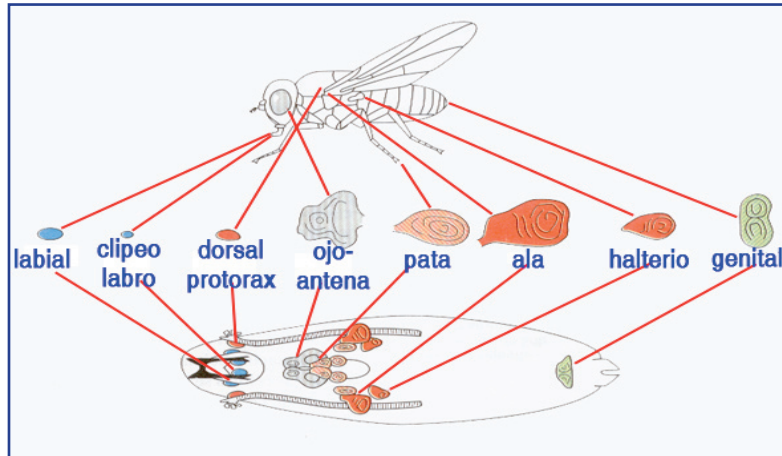


**Figura I.2.- Ciclo de vida de *Drosophila***  
(Tomada de *Developmental Biology* 7ª  
Edición. S.F Gilbert 2003)

Durante la embriogénesis (0-24 horas después de la puesta) el cigoto pasa de ser una célula única a una larva móvil. La larva pasa por tres etapas, separadas por sus respectivas mudas, con una duración total de 4 días. Durante los cuales crece en tamaño y acumula nutrientes. Mientras los dos primeros periodos larvares duran cada uno 24 horas, la larva pasa dos días en el tercer estadio. Aproximadamente 120 horas después de la puesta, la larva deja de alimentarse y tiene lugar la pupación, formándose el pupario a partir de la expansión y endurecimiento de la cutícula larvaria. Durante este estadio ocurre la metamorfosis, emergiendo el individuo adulto o imago al cabo de 4 días (Figura I.2). En esta fase, la mayoría de los tejidos larvares serán destruidos y reemplazados por tejidos adultos (Ashburner and Gubb, 1989; Lawrence and Morata, 1992).

### 1.2.2.- El disco imaginal de ala, como modelo experimental.

Las estructuras cuticulares adultas - cabeza, tórax, alas, patas, genitalia, analia - se forman a partir de grupos celulares precursores, determinados en la embriogénesis, que se denominan discos imaginales. En la larva hay nueve pares de discos imaginales más un disco genital, que crecen desde decenas a decenas de miles de células durante el periodo larvario (Figura I.3).



**Figura I.3.-Discos imaginales.**

Correspondencia de los discos imaginales con las estructuras adultas que forman (tomada del Alberts, 1994, con modificaciones)

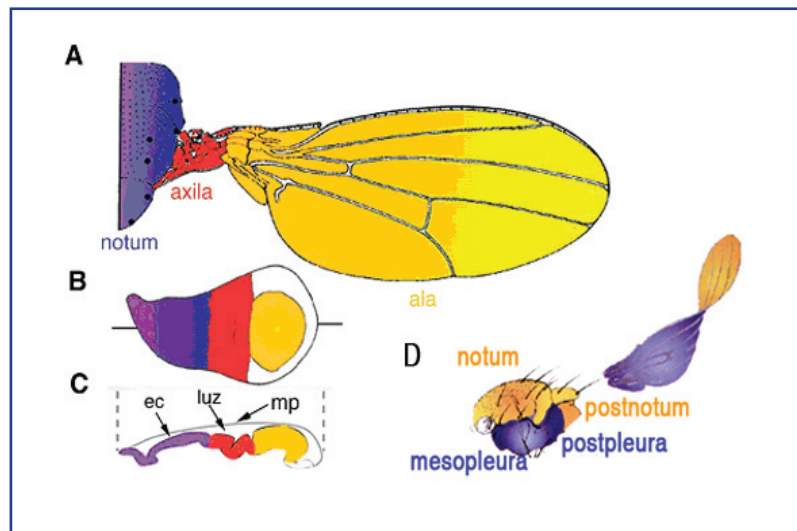
En este trabajo nos hemos centrado principalmente en el estudio del disco imaginal de ala, que da lugar a la mayor parte del tronco (formado por las estructuras del notum y la pleura) y el ala. La unión del ala adulta al tronco se realiza mediante la axila, que supone el borde entre ambas estructuras. El tórax adulto se forma a partir de dos discos imaginales de ala, que se despliegan durante la pupación hasta encontrarse y fusionarse en la región media del cuerpo (Figura I.4).

El disco imaginal de ala de *Drosophila* ha servido como modelo para el estudio de la formación de patrones morfológicos durante el desarrollo. El estudio de los mecanismos genéticos y moleculares que intervienen en este proceso ha sido clave para identificar los genes y las vías de señalización implicadas, y cuya función está conservada también durante el desarrollo de vertebrados. En esta introducción trataremos dar una visión global de las vías de señalización que participan en el desarrollo del ala.

En los años 70, García Bellido y sus colaboradores propusieron la teoría de los compartimentos, según la cual las estructuras adultas de la mosca están divididas en poblaciones de células de distinta identidad separadas por restricciones de linaje (García-Bellido et al., 1973). La existencia de estos compartimentos, determinados genéticamente, impide que células de compartimentos adyacentes se mezclen entre sí. Los compartimentos se



definen inicialmente por la expresión de los genes selectores, que funcionan como una señal binaria de encendido/apagado (Garcia-Bellido, 1975; revisado en Mann and Morata, 2000). Los genes selectores regulan la expresión de genes específicos en las células de un mismo compartimento. Después, las células situadas en el borde entre dos compartimentos actúan como “centros organizadores” mediante la producción de factores difusibles de largo alcance, los cuales regulan la proliferación y dan lugar a consecutivas subdivisiones del disco imaginal en regiones más pequeñas (revisado en Irvine and Rauskolb, 2001).



**Figura I.4.-Esquema de torax y ala de adulto y disco imaginal.**

A) Visión dorsal de las estructuras del tórax y del ala de un adulto.

B) Esquema de un disco imaginal de ala, de tercer estadio larvario. En él se destaca la correspondencia de las distintas estructuras adultas con las zonas presuntivas de ala (amarillo), de axila (rojo) y notum (violeta). La región blanca da lugar a las pleuras. Cedido por el Dr. Francisco Martín.

C) Esquema de un corte ortogonal del disco de ala en el que se destaca la membrana peripodial (mp), el epitelio columnar (ec) y la luz del disco. Modificado de (Tabata y Takei, 2004).

D) Esquema del ala, notum y pleura adulta mostrando la naturaleza dorsal (amarillo) o ventral (azul) de estas estructuras. El notum es dorsal, mientras que la pleura es ventral. (Imagen tomada de la Tesis Doctoral de Dr. Silvia Aldaz, 2004).

El disco imaginal está constituido por dos caras opuestas, entre las que se encuentra la luz del saco o lumen. Al final del tercer estadio larvario, las células que componen el disco imaginal de ala presentan tres tipos de morfología diferente: columnar, cuboidal y escamosa. Una cara contiene a la mayoría de las células del disco propio en forma de una monocapa de epitelio columnar y células cuboidales, mientras que la otra cara, la membrana peripodial, está compuesta por una monocapa de células escamosas rodeada de células cuboidales también denominadas células del margen (Baena-Lopez et al., 2003) (Figura I.4C). A pesar de que la contribución de células de la membrana peripodial en la epidermis adulta es muy pequeña,

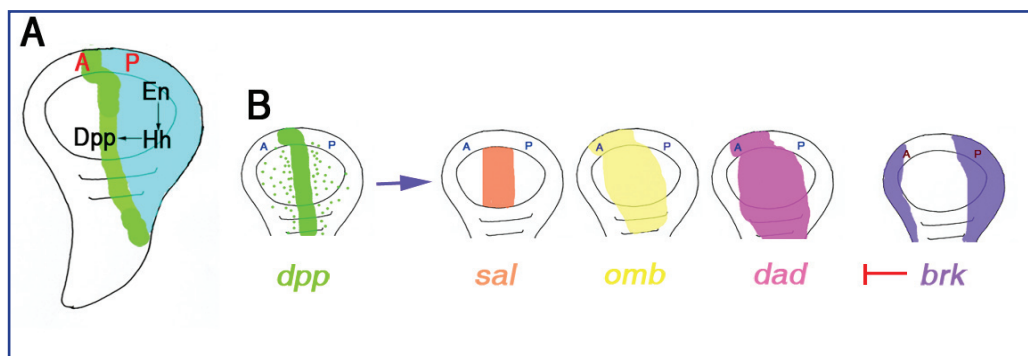
su papel es esencial para la eversión y cierre de los discos durante la metamorfosis (Martin-Blanco et al., 2000).

Las células del epitelio columnar darán lugar al territorio prospectivo del tórax y del ala, mientras que las células cuboidales formarán la pleura ventral y lateral del individuo adulto. En el epitelio del disco imaginal se distinguen dos subdivisiones: una que dará lugar a un compartimento anterior (A) y otro posterior (P) y otra subdivisión que dará un compartimento dorsal (D) y otro ventral (V). Estos compartimentos están separados por sus respectivos bordes de restricción de linaje (revisado en Blair, 2003; Dahmann and Basler, 1999; Tabata and Takei, 2004).

Existe una tercera división a lo largo del eje próximo-distal (P/D) entre el territorio de notum y ala, pero el borde notum-ala no es un borde de compartimento ya que no existe aquí una restricción de linaje (Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002a; Zecca and Struhl, 2002b).

### ***La especificación del eje Antero-Posterior.***

La identidad de las células del compartimento P está determinada por la expresión del gen selector *engrailed* (*en*), que codifica un factor de transcripción con un homeodominio (Guillen et al., 1995; Kornberg et al., 1985; Morata and Lawrence, 1975). Esta expresión es heredada del ectodermo embrionario, donde se originan las células imaginales. En induce la expresión de la proteína Hedgehog (Hh), en las células P (Tabata et al., 1992), y reprime la expresión de la proteína Cubitus interruptus (Ci), un efector esencial en la vía de Hh (Eaton and Kornberg, 1990). La proteína Hh actúa como un morfógeno de corto alcance, e induce la expresión de la proteína difusible Decapentaplegic (Dpp), en una estrecha línea de células A.



**Figura I.5.- Esquema de la división A/P del disco imaginal de ala.**

A) Representación de los compartimentos A y P. En el compartimento P, la expresión del gen selector *en*, induce la expresión de la proteína Hh. Hh induce la expresión de Dpp en una estrecha banda de células A, adyacentes al borde A/P.

B) Representación de los genes activados en el eje A/P en respuesta al gradiente de Dpp.

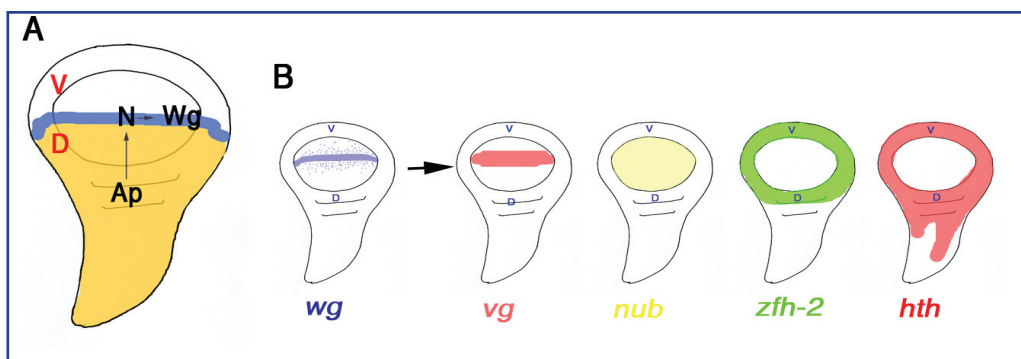
Este grupo de células que expresan Dpp, a lo largo del eje A/P, constituye un centro organizador (revisado en Methot and Basler, 1999)(Figura I.5A).

Dpp difunde a ambos lados del borde A/P, actuando como un morfógeno de largo alcance

e induciendo el crecimiento del ala, más allá del dominio central. Además del crecimiento, Dpp activa la expresión de diferentes genes, dependiendo de su concentración, que son los encargados de definir el patrón de las diferentes regiones del ala (Capdevila and Guerrero, 1994; Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996; Zecca et al., 1995) (Figura I.5B). Estos genes son: *spalt* (*sal*) que responde a altos niveles de Dpp y *optomotor-blind* (*omb*), dos factores de transcripción, y *daughter against dpp* (*dad*) que codifica una proteína Smad represora que regula la vía Dpp. Además, Dpp reprime la expresión de *brinker* (*brk*), un regulador negativo de la vía, que se expresa en los dominios más laterales del disco imaginal de ala (revisado en Tabata and Takei, 2004).

### ***La especificación del eje Dorso-Ventral.***

En la fase temprana del desarrollo del primordio del ala, cuando está formado por un pequeño grupo de unas 100 células, el gen selector *apterous* (*ap*) se expresa en las células dorsales por la actividad de la vía EGF-R (Blair et al., 1994; Diaz-Benjumea and Cohen, 1993). Ap es un factor de transcripción con un LIM-homeodominio (Figura I.6A).



**Figura I.6 Esquema de la división D/V del disco imaginal de ala.**

A) Representación de los compartimentos D y V. En el compartimento D, la expresión del gen *ap*, genera un borde de compartimento donde se activa la vía de Notch mediante señales de corto alcance. Notch activa en estas células la expresión de *Wg*, que actúa como un morfógeno de largo alcance.

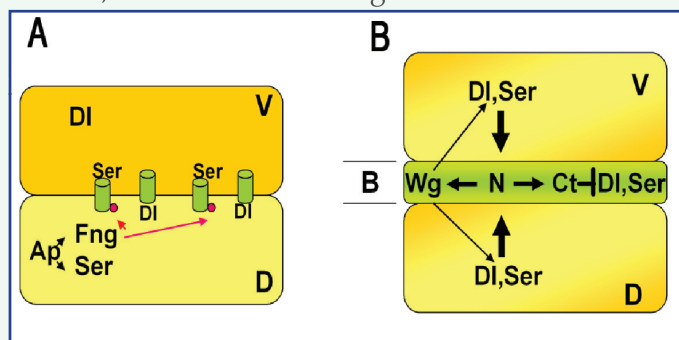
B) Representación de los genes activados en el eje D/V en respuesta a la señal mediada por *Wg*.

La expresión de *Ap* en las células D activa la expresión del ligando de Notch Serrate (*Ser*) y de una proteína glicosiltransferasa, *Fringe* (*Fng*) y además, restringe la expresión de *Delta* (*Dl*), un segundo ligando de Notch, a las células V (de Celis et al., 1996; Diaz-Benjumea and Cohen, 1995; Doherty et al., 1996; Irvine and Wieschaus, 1994; Milan and Cohen, 2000). *Fng* modifica la capacidad de respuesta del receptor Notch, haciendo que las células D repondan a *Dl* (Fleming et al., 1997; Panin et al., 1997), mientras que en las células V, el receptor Notch no modificado es capaz de responder mejor a la señal de *Ser*. La diferente capacidad de respuesta del receptor Notch en los compartimentos opuestos asegura la activación de la vía de Notch exclusivamente en las células del borde D/V.

De ese modo, la señalización de corto alcance mediada por Notch establece otro centro organizador, constituido por las células del borde que secretan Wg, el cual actúa como un morfógeno de largo alcance. En el segundo estadio larvario, la acción combinada de Notch y Wg en el borde D/V dirige una respuesta temporalmente dinámica en la elaboración del patrón morfogenético a lo largo del eje P/D. La actividad conjunta de Notch y Wg activan la expresión de la proteína nuclear Vestigial (Vg), esencial para el desarrollo del territorio que va a dar lugar al ala, y la expresión del gen *nubbin* (*nub*). La actividad de Vg y Nub definen el territorio más distal del ala y reprimen la expresión de los genes *teashirt* (*tsh*), *zinc finger homology-2* (*zfh-2*) y *homothorax* (*hth*) en este territorio, quedando su expresión confinada a la región proximal (Whitworth and Russell, 2003) (Figura I.6B).

#### Caja 1: El borde D/V

Tras la activación de Notch en las células del borde D/V, el retro-control positivo entre Notch y sus ligandos lleva a un aumento de actividad de la vía, que produce la expresión primero de Wingless (Wg) y más tarde de Cut (Ct) (de Celis et al., 1996; Diaz-Benjumea and Cohen, 1995; Micchelli et al., 1997). Wg refuerza la expresión de Dl y Ser a cada lado de su dominio de expresión, generándose así un mecanismo de retrocontrol positivo que ayuda al mantenimiento de la expresión de Wg y Cut (de Celis and Bray, 1997; Micchelli et al., 1997). Mas tarde, los altos niveles de Dl/Ser inducidos por Wg a ambos lados de las células del borde, tienen un efecto negativo en la activación



**Figura Caja 1.- Representación de la activación de la vía de Notch en las células del borde D/V.**

A) Estadio temprano durante la formación del borde D/V. La expresión asimétrica de los ligandos *Dl* y *Ser*, así como de *Fng*, que modifica al receptor en las células D (puntos rojos), asegura la activación de Notch exclusivamente en las células del borde D/V.

B) En una fase posterior del desarrollo del ala, la expresión de los li-

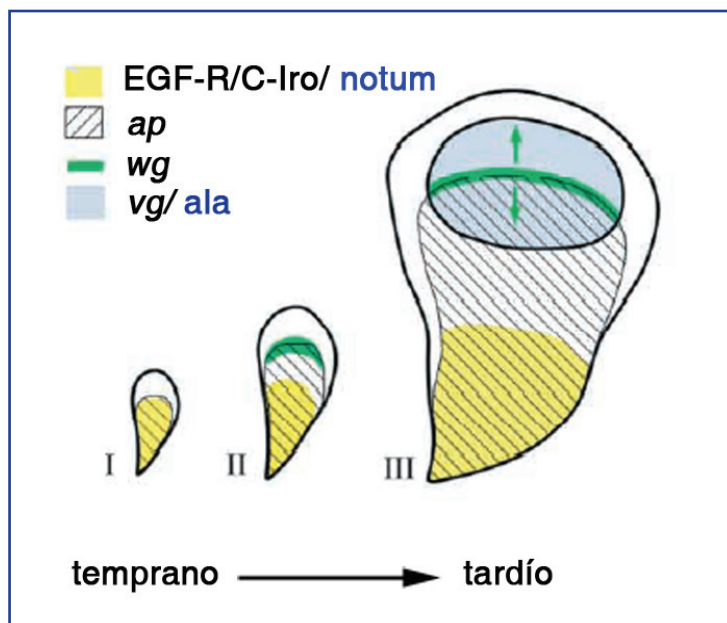
gandos *Dl* y *Ser* comienza a ser simétrica a ambos lados del borde, y se establece un bucle de regulación positiva entre *Wg* y las células que expresan *Dl/Ser*. La actividad de Notch en las células del borde, induce la expresión de *Cut* que reprime la expresión de *Dl* y *Ser*, ayudando así a mantener la actividad de *N* y la expresión de *Wg* en las células del borde.

de la vía de Notch (de Celis and Bray, 1997). La actividad de *Cut* reprime la expresión de *Dl* y *Ser* en las células del borde y de esta forma ayuda a mantener la actividad de Notch y la expresión de *Wg* sólo en dichas células (Figura caja 1). Además, *Cut* impide que estas células, a pesar de expresar *Wg*, puedan responder a su señal, regulando transcripcionalmente los genes implicados en la degradación de Armadillo (*Arm*), efector de la vía canónica de *Wg* (Buceta et al., 2007). La función represora de *Cut* sobre la actividad de *Wg* en las células del borde y la función represora de *Wg* sobre la vía de Notch en las células fuera del borde, genera dos dominios mutuamente excluyentes de actividad de Notch y *Wg*, correspondiente a las células del borde y a las células adyacentes del borde, respectivamente. Ambas vías actúan, sin embargo, de modo sinérgico en el control del crecimiento y supervivencia celular (Giraldez and Cohen, 2003).

### ***La especificación del eje Próximo-Distal.***

La formación de patrón y el crecimiento del disco imaginal de ala depende no sólo de las subdivisiones en los compartimentos A/P y D/V, sino también de la subdivisión en el eje próximo-distal.

En etapas tempranas, la vía de señalización EGF-R, además de activar Ap en las células D, promueve la subdivisión del disco imaginal de ala en dos nuevos dominios debido a las funciones antagónicas de Wg y EGF-R que definen los territorios de ala y notum respectivamente (Baonza et al., 2000; Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002a). Esta segregación del territorio en las células propias del disco ocurre simultáneamente a los cambios morfológicos de las células de la membrana peripodial, sugiriendo que el mismo mecanismo de segregación P/D está también activo en el epitelio peripodial (Baena-López et al., 2003). En el segundo estadio larvario, la vía EGF-R dirige la expresión del complejo de genes *iroquois* (*C-iro*) en las células mas proximales del disco, y hace que estas adquieran una identidad diferente a la de las células vecinas del territorio de ala (Figura I.7).



**Figura I.7.- Esquema de la división del ala en el eje próximo-distal.**

**I)** Tempranamente durante el desarrollo larvario, altos niveles de EGF-R activan la expresión de los genes *ap* (rayas) e *Iro-C* (amarillo) dentro de la región dorsoproximal del disco. **II)** Durante el desarrollo, el mantenimiento de la expresión de *Iro-C* depende de un continuo “input” de señal EGF-R, de modo que su expresión queda restringida al área donde hay altos niveles de EGF-R. **III)** La expresión de *Wg*, *Vg* y otros “organizadores” (verde) promueven la subdivisión en el eje próximo-distal del ala

prospectiva en: ala (definido por la expresión de *Vg*, azul), notum (definido por la expresión de *Iro-C*, amarillo) y hinge (definido por la ausencia de ambos, blanco). (Imagen tomada de Zecca and Struhl, 2002a, con modificaciones)

Además de las vías principales de señalización hasta ahora descritas, existen otras que controlan también la proliferación celular como la vía JAK/STAT. Sin embargo, no existe un estudio muy detallado del papel que juega esta vía durante el desarrollo imaginal de ala. La vía JAK/STAT fue identificada inicialmente en vertebrados, pero sus componentes estructurales y funcionales están conservados a lo largo de la evolución. En *Drosophila*, existe un único ligando conocido, Unpaired (Upd) (Harrison et al., 1998), que se une al receptor Domeless (Dome) (Brown et al., 2001) provocando la activación del receptor y la fosforilación de Hopscotch (Hop) (proteína de *Drosophila* homologa a JAK) (Binari and Perrimon, 1994). Hop atrae a la membrana a la proteína STAT92E (proteína de *Drosophila* homologa a STAT), y la fosforila, formándose de esta manera dímeros capaces de traslocarse al núcleo donde actúan como factores de transcripción (Yan et al., 1996; Darnell, 1997). Durante el desarrollo del disco imaginal de ala, la vía JAK/STAT y la proteína STAT92E tienen tanto efectos proliferativos como antiproliferativos (Mukherjee et al., 2005), de forma similar a las proteínas STAT 3 y STAT 1, respectivamente, en vertebrados.

Como hemos visto, durante el desarrollo de un organismo las rutas de señalización multiplican y diversifican sus funciones, ejerciendo distintos efectos dependiendo de dónde y cuando se activen o repriman. De este modo, una misma señal puede ser interpretada por la célula receptora de diferentes maneras, dependiendo del lugar y momento de desarrollo. Por ejemplo la señal de Wg durante el desarrollo embrionario es clave para determinar el patrón de la epidermis, mientras que durante el desarrollo larvario la misma señal es esencial para determinar el destino de ala en las células del disco imaginal.

Como si de un mapa de coordenadas se tratase, cada célula ocupa una posición concreta dentro del disco imaginal, de modo que el conjunto de las señales que recibe hace que adquiera un programa génico específico. A lo largo del desarrollo del disco imaginal del ala, la expresión de estos genes determina la identidad de las células del disco, a la vez que dirige la proliferación coordinada del mismo para que el ala alcance el tamaño adecuado. A nivel individual, cada célula tendrá que integrar todas las señales que recibe para elaborar una respuesta final que determine su estado y su comportamiento, traducido en regulación de la expresión génica. Estos procesos de integración son en parte posibles por la presencia de genes moduladores (cofactores), con funciones claves para el control temporal y espacial de la expresión génica.



De este modo, parece que si bien *drm*, *odd* y *sob* podrían tener funciones redundantes durante el desarrollo, la función de Bowl podría ser diferente. (Green et al., 2002). Recientemente, estudios sobre las secuencias de estas proteínas marcan una diferencia notable entre ellas, ya que se ha visto que Bowl y Odd contienen en su secuencias motivos eh-1, capaces de interactuar con Gro y por tanto de modificar sus efectos sobre la transcripción (Goldstein et al., 2005; Tena et al., 2007).

Los genes de la familia *odd-skipped* y *lines* están conservados evolutivamente. Así, en vertebrados se han identificado los genes *odd related sequences-1* y *2* (*ors1* y *ors2*) y *lines homology* respectivamente. Es posible, por tanto, pensar que el mecanismo de interacción de estos genes esté también conservado evolutivamente en otros organismos.

## 2.-LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

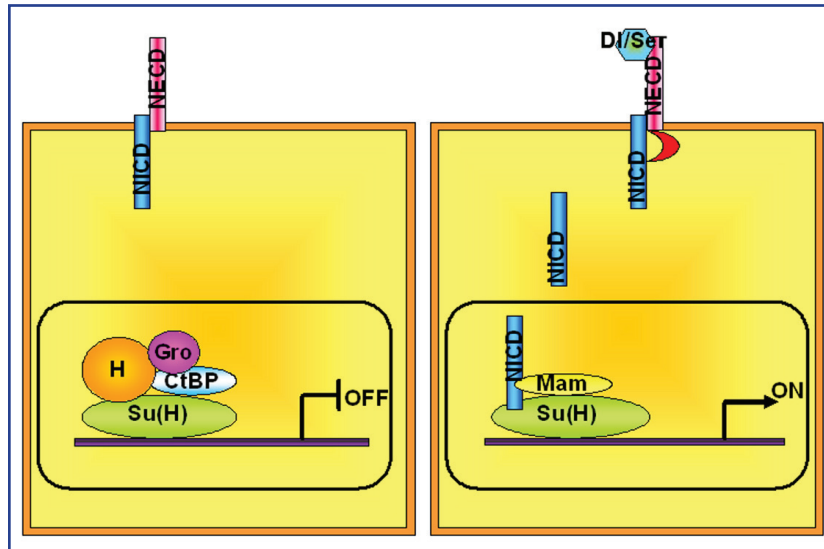
La transcripción de un gen es el nivel básico de regulación de la expresión génica. En este nivel el control de la expresión depende de la unión de factores de transcripción a secuencias específicas de la región reguladora, llamadas elementos reguladores (en inglés *enhancers*), y del reclutamiento de complejos proteicos que les permitan llevar a cabo su función activadora y/o represora. Además de los factores de transcripción específicos de secuencia, la regulación de la expresión génica depende de las modificaciones químicas a las proteínas Histonas que forman la cromatina, y a procesos de remodelación de su estructura.

Entre los factores de transcripción, existen ejemplos como Ap y Brk que actúan como activador y represor directos respectivamente. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la actividad reguladora de estos factores depende de la interacción con otros cofactores formando complejos proteicos. De este modo, un mismo factor de transcripción puede activar o reprimir la expresión de diferentes genes en distintos momentos del desarrollo, dependiendo del complejo proteico que forme. Muchos de estos moduladores que se unen a los factores de transcripción, son exclusivos de una vía determinada (Axina en la vía de Wg) y otros cofactores son compartidos por diferentes rutas de señalización (Groucho; Gro). Los miembros de la familia Gro/TLE (*transducin like Enhancer-of-split*) son cofactores que tienen una importante función en la regulación de diferentes vías de señalización, entre las que se incluyen Notch, Wg/Wnt y Dpp/ TGF-beta (Buscarlet and Stifani, 2007). Gro, que por sí mismo no es capaz de unirse a ADN, es reclutado a los promotores diana a través de su unión a otras proteínas. Estas uniones se realizan a través de dos dominios conservados: el dominio *engrailed* *homology-1* (eh-1) o el dominio WRPW (Buscarlet and Stifani, 2007).

### 2.1.-La regulación de la vía de Notch.

La vía de Notch controla múltiples procesos durante el desarrollo de organismos multicelulares, tanto en vertebrados como en invertebrados (Bray, 2006). En ausencia de señal, la proteína Su(H) funciona como represor de los genes diana regulados por Notch, mediante su unión a Hairless (H), un antagonista de esta vía (Morel et al., 2001). El complejo Hairless-Su(H) actúa como represor a través del reclutamiento de los co-represores Gro y C-terminal Binding Protein (CtBP) (Barolo et al., 2002; Morel et al., 2001; Nagel et al., 2005). En presencia de señal activadora Notch, sufre un procesamiento proteolítico (De Strooper et al., 1999; Schroeter et al., 1998; Struhl and Adachi, 1998; Struhl and Greenwald, 1999) y su dominio intracelular (NICD) se trasloca al núcleo, donde se une a Su(H) y al activador transcripcional Mastermind (Man), permitiendo la activación de la transcripción de sus genes diana (Jarriault et al., 1995) (Figura I.8).



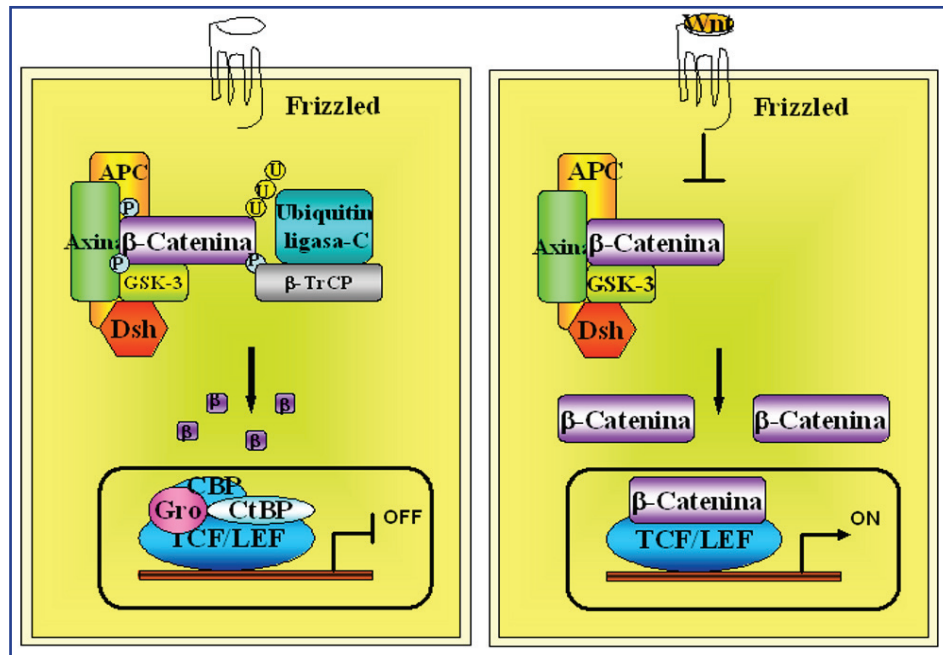


**Figura I.8.- Esquema de la regulación transcripcional de la vía de Notch.** La unión de los ligandos DI/Ser, promueve el procesamiento proteolítico del dominio intracelular del receptor Notch (NICD), que se desplaza al núcleo y forma un complejo activador junto con el factor Su(H). En ausencia de señal, Su(H) forma un complejo represor junto con H, Gro y CtBP.

## 2.2.-La regulación de la vía de Wg.

La familia de glicoproteínas secretables Wnt regula diferentes aspectos del desarrollo tales como la especificación de identidad celular, proliferación celular, polaridad planar y migración celular, mediante diferentes rutas de señalización conservadas evolutivamente (Logan and Nusse, 2004). En el caso de la vía canónica de Wg, el efector final es el factor de transcripción Tcf (del inglés *T-cell factor*). Al igual que en el ejemplo anterior, Tcf puede actuar como un activador o como un represor de los genes dianas de Wg, y su actividad depende de los cofactores a los que se une en cada momento del desarrollo. La activación de la vía por la unión de Wg a su receptor, provoca la estabilización de la proteína  $\beta$ -catenina (Arm, en *Drosophila*), encargada de transmitir la señal desde el receptor hasta el núcleo, donde se une a Tcf formando un complejo activador de la transcripción. Sin embargo, en ausencia de la señal de Wg,  $\beta$ -catenina es degradada a través de un complejo proteico que contiene a la proteína Axina (DasGupta et al., 2005; Miller et al., 1999). En ausencia de  $\beta$ -catenina/Arm, es el co-represor Gro el que se une a Tcf, dirigiendo su actividad como represor (Cavallo et al., 1998; Lawrence et al., 2000) (Figura I.9).

Las vías de Notch y Wg representan dos de los principales canales de comunicación intercelular usados por las células para controlar sus identidades y comportamiento durante el desarrollo de invertebrados o vertebrados. En *Drosophila*, la interacción de ambas vías ha sido ampliamente estudiada en el contexto de desarrollo y formación del ala (Klein and Arias, 1999). En este sistema, Gro es capaz de interaccionar con múltiples factores de transcripción,



**Figura I.9.- Esquema de la regulación transcripcional de la vía de Wg.**

La unión de Wg al receptor Frizzled, impide la degradación de beta-catenina/Arm por Axina. La estabilización de  $\beta$ -catenina/Arm citoplasmática permite su translocación al núcleo donde se une a Tcf, desplazando al complejo represor formado por Gro, CBP y CtBP y cambiando su función a activador transcripcional.

entre los cuales se incluyen no sólo los de las vías de Wg y de Notch, sino también los factores transcripcionales efectores de las vías Dpp y Hh, como son Brk y Ci respectivamente (Hasson and Paroush, 2006). Además se ha visto que la fosforilación de Gro mediada por MAPK-P, la forma fosforilada y activa de MAPK que se produce en respuesta a la activación de la vía EGF-R, compromete la capacidad represora del mismo (Hasson et al., 2005). El hecho de que los mismos cofactores puedan modular la transcripción en respuesta a diferentes vías de señalización, es un aspecto central de las interacciones entre diferentes vías durante el desarrollo.

En este trabajo de Tesis presentamos resultados sobre la función de algunos de los cofactores que pueden estar modulando simultáneamente diferentes vías de señalización. Nos hemos centrado en la función del gen *lines* y su interacción con la familia de factores de transcripción Odd-Skipped, durante el desarrollo imaginal del ala.

### 3.-FUNCIÓN DE LINES Y LA FAMILIA ODD-SKIPPED.

En *Drosophila*, el gen *lines* junto con la familia génica Odd-Skipped constituyen una nueva red reguladora implicada en la integración de diversas vías de señalización (Hatini et al., 2005). La familia de proteínas Odd-Skipped incluye diferentes factores de transcripción que comparten homología en su secuencia: el propio Odd-skipped (Odd), Brother of odd with entrail limited (Bowl), Drumstick (Drm), y Sister of odd and Bowl (Sob). Estos factores interactúan con Lines en múltiples procesos durante la embriogénesis. Así, en la formación de la epidermis del embrión Drm/Lines/Bowl regulan la diferenciación celular de la epidermis dorsal coordinando las respuestas a las vías de Hh y Wg, (Bokor and DiNardo, 1996; Hatini et al., 2000; Hatini et al., 2005). Durante el desarrollo del intestino estas mismas proteínas regulan de vía de señalización de JAK/STAT (Green et al., 2002; Iwaki et al., 2001; Johansen et al., 2003; Wang and Coulter, 1996). La función de alguno de estos genes también se requiere durante el desarrollo imaginal del disco de pata, donde la expresión de Bowl está regulada por la vía de Notch, y se ha descrito su participación en la elaboración del patrón próximo-distal (de Celis Ibeas and Bray, 2003; Hao et al., 2003). También estos genes regulan, durante el desarrollo del ojo, la actividad de la vía de Hh en la inducción de la retinogénesis (Bras-Pereira et al., 2006)

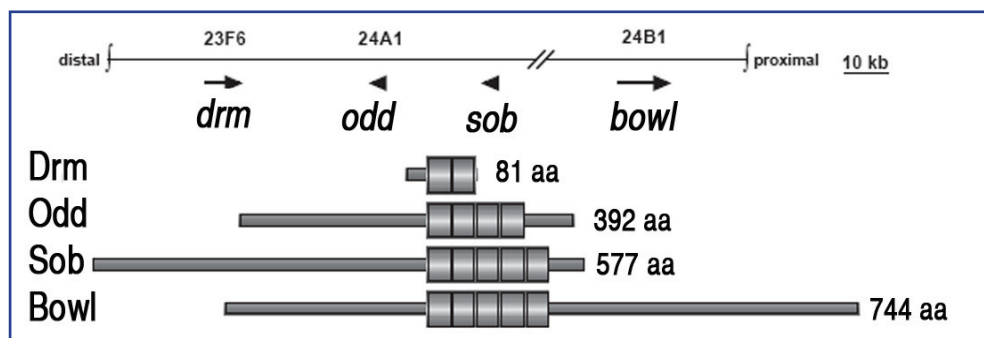
#### 3.1.-Lines

El gen *lines* fue descrito por primera vez como un gen de polaridad segmental, identificado por los defectos en la cutícula larvaria que causa su falta de función (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). *lines* se activa en las primeras etapas de la embriogénesis, y participa en la formación del patrón epidérmico. Este gen produce un único ARNm que codifica una proteína de 80 KDaltons, que carece de dominios con homologías destacables, salvo por poseer una región aminoterminal ácida.

Antes de conocerse las interacciones entre Lines y los miembros de la familia Odd-Skipped, se postuló que Lines era un elemento modulador en la función de especificación de identidad celular por la proteína homeótica Abdominal-B (Abd-B) (Castelli-Gair, 1998). Posteriormente, varios estudios implicaron a Lines como un modulador de la expresión génica en respuesta a la vía de señalización de Wg (Bokor and DiNardo, 1996; Hatini et al., 2000). Por último, se ha demostrado que la función de Lines, está estrechamente ligada a la de la familia Odd-Skipped, en diferentes procesos del desarrollo, y se ha propuesto que estas proteínas participan en una cascada de regulación génica modulando el estado de acumulación del efector final, Bowl. (Hatini et al., 2005).

### 3.2.-Odd- Skipped

Como se mencionó anteriormente, los genes *drm*, *odd*, *sob* y *bowl*, que forman parte de la familia de genes *odd-skipped*, son genes de segmentación del grupo “pair-rule” y fueron identificados por los defectos que causaban en la cutícula del embrión. Todos estos genes codifican factores de transcripción de unión a ADN, a través de motivos de “dedos de zinc” del tipo  ${}^n(C_2H_2)$ . Existe un alto grado de conservación entre estos motivos, aunque varía el número. Así, *drm* posee dos, *odd* posee cuatro y *sob* y *bowl*, que son los mas parecidos entre sí, poseen cinco motivos dedos de Zn. *drm*, *odd* y *sob* se localizan en tandem en el brazo derecho del cromosoma 2, mientras que *bowl* se localiza en el brazo izquierdo de este cromosoma (Figura I.10)



**Figura I.10.- Familia de genes Odd-Skipped.**

Mapa citológico mostrando la localización de los genes *drm*, *odd*, *sob* y *bowl* en el brazo derecho del cromosoma 2. Los tamaños de las proteínas se indican a la derecha en número de aminoácidos (aa). Entre todos existe un alto grado de conservación en las secuencias correspondientes a los motivos de dedos de Zn, pero poca similitud en el resto de la secuencia. (Imagen tomada de Green et al., 2002).

Aunque el mecanismo por el cual se ha generado esta familia de factores de transcripción se desconoce, es posible que deba su existencia a un proceso de duplicación génica a partir de un antecesor común (Hart et al., 1996). La duplicación génica es un importante mecanismo evolutivo por el cual se generan familias de genes que codifican proteínas estructuralmente similares, con funciones relacionadas, pero divergentes.

Generalmente el hecho de que los genes se co-expresen es un indicio de posibles funciones solapantes o redundantes, mientras que un patrón de expresión diferente sugeriría funciones divergentes. En el caso de *odd*, *sob* y *drm*, se ha visto que tienen una expresión espacial muy similar en el embrión (Hart et al., 1996). En el disco imaginal de pata, las expresiones de *odd*, *sob* y *drm* también son solapantes, expresándose en anillos concéntricos en regiones proximales. Sin embargo *bowl* no se expresa como los anteriores ni en el embrión ni en el disco imaginal de pata, donde se expresa además en regiones distales a los dominios de expresión de *drm*, *odd* y *sob* (Hao et al., 2003).



Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido el estudio funcional del gen *lines* y la familia génica *odd-skipped* durante el desarrollo imaginal del disco de ala. Para ello hemos tratado de responder a tres preguntas fundamentales en base a las cuales nos planteamos consecutivos objetivos:

***¿Cuál es la función del gen *lines* en el disco imaginal de ala?***

- 1.- Estudiar el patrón de expresión del gen *lines* en el disco imaginal de ala, así como la localización subcelular de la proteína Lines, generando sondas de ARN y un anticuerpo específico anti-Lines.
- 2.- Analizar la función del gen *lines*, mediante el estudio de las consecuencias fenotípicas de su falta de función, en los distintos estadios del disco imaginal, y los efectos de su ganancia de función.
- 3.- Analizar las interacciones del gen *lines* con las vías de señalización que intervienen en la morfogénesis y la proliferación celular del disco imaginal de ala.

***¿Interaccionan los miembros de la familia *Odd-skipped* con *Lines* para mediar su función en el desarrollo del disco imaginal de ala?***

- 4.- Describir el mecanismo por el que *lines* actúa en el disco imaginal de ala mediante el estudio de la interacción genética y molecular entre *lines* y los distintos miembros de la familia de genes *odd-skipped*.
- 5.- Analizar de forma comparativa, la función de los miembros de la familia *odd-skipped* en el desarrollo de los distintos discos imaginales.

***¿Cuál es el mecanismo de acción por el que *Lines* y los miembros de la familia *Odd-skipped* pueden regular la integración de diferentes vías de señalización durante el desarrollo del disco imaginal de ala?***

- 6.- Determinar los efectos temporales causados por la falta de la proteína Lines. Este paso nos permitirá diferenciar el tiempo en el que tienen lugar los distintos efectos causados por la falta de *lines*.
- 7.- Analizar a qué nivel actúa Lines dentro de las vías de señalización afectadas en células mutantes *lines<sup>-</sup>*, utilizando formas dominantes negativas o activas constitutivamente de diferentes componentes de dichas vías de señalización.
- 8.- Estudiar la relación de *lines/odd-skipped* con proteínas reguladoras que son compartidas por diferentes vías de señalización, y proponer un posible mecanismo de acción que explique su función durante el desarrollo en el disco imaginal de ala.

## Materiales y Métodos



## 1. MATERIALES Y MÉTODOS GENÉTICOS E HISTOLÓGICOS.

### 1.1.-Estirpes de moscas utilizadas.

El cuidado de las moscas y su manipulación se realizó siguiendo técnicas descritas en Ashburner, (1989). Los cruces se mantuvieron en un medio de cultivo estándar para *Drosophila* y en un incubador a 25°C, excepto cuando se especifique lo contrario.

Las estirpes de moscas mutantes utilizadas para los estudios de falta de función fueron:

-*lin*<sup>G1</sup> es un alelo nulo que da lugar a una proteína truncada no funcional de 108 aminoácidos, en lugar de los 858 aminoácidos de la proteína silvestre, debido a un cambio de C a T en la región codificante (Bokor and DiNardo, 1996).

-*bowl*<sup>2</sup> es un alelo letal embrionario, de pérdida de función de *bowl*, debido a una mutación en el segundo dedo de Zinc (H284Y) (Wang and Coulter, 1996; de Celis Ibeas and Bray, 2003).

-*gro*<sup>1</sup> es un alelo hipomorfo que reduce los niveles de expresión de *gro* (Preiss et al., 1988).

Para estudiar la expresión de distintos genes, se emplearon estirpes de moscas que contienen inserciones de elementos P(*lacZ*) que responden a las secuencias reguladoras específicas de cada gen. Las estirpes utilizadas fueron: *brk-LacZ* (Minami et al., 1999), *bab-lacZ* (Godt et al., 1993), *dad-lacZ* (Kai and Spradling, 2003), *dpp-lacZ* (Blackman et al., 1991), *kek-lacZ* (Musacchio and Perrimon, 1996), *omb-lacZ*, *pucE69-lacZ* (Martin-Blanco et al., 1998), y *STAT92E-lacZ* (Berkeley *Drosophila* Genome Project, BDGP <http://flystocksbio.indiana.edu>). Todas estas líneas muestran un patrón de expresión, revelado con un anticuerpo anti-β-galactosidasa, que se corresponde generalmente con el patrón de expresión del ARNm correspondiente obtenido por hibridación *in situ*.

Las estirpes de moscas transgénicas empleadas se detallan en la siguiente tabla:

Tabla MM.1.- Líneas transgénicas	
UAS- <i>trangen</i>	Referencia
UAS- <i>bowl</i>	(de Celis Ibeas and Bray, 2003)
UAS- <i>drm</i> C57G	(Lengyel and Iwaki, 2002)
UAS- <i>odd</i>	(Hao et al., 2003)
UAS- <i>sob</i> 10.1	(Hao et al., 2003)
UAS- <i>lines-cMyc</i>	(Hatini et al., 2000)
UAS- <i>hairless</i>	(Klein et al., 2000)
UAS- <i>gro</i>	(Apidianakis et al., 2001)
UAS-DN <i>raf</i> <sup>3.1</sup>	(Martin-Blanco et al., 1999)
UAS- <i>arm</i> <sup>S10</sup>	(Pai et al., 1997)
UAS- <i>dTcf</i>	(van de Wetering et al., 1997)
UAS- <i>N<sup>ICD</sup></i>	(de Celis and Bray, 1997)
UAS- <i>lines</i> ARNinterferente	Viena <i>Drosophila</i> RNAi Center <a href="http://stockcenter.vdrc.at">http://stockcenter.vdrc.at</a>
UAS- <i>bowl</i> ARNinterferente	Viena <i>Drosophila</i> RNAi Center <a href="http://stockcenter.vdrc.at">http://stockcenter.vdrc.at</a>



El resto de estirpes de moscas utilizadas durante la realización de esta tesis se detallan en cada apartado.

## 1.2.-Obtención de moscas transgénicas *UAS-bowl-VP16*.

La construcción del transgen *UAS-bowl*  $\Delta^{eh-1}$ -VP16 se detalla en el apartado 2.3.2. El ADN de esta construcción fue inyectado en embriones de la estirpe yw 1118, usando la técnica estándar de microinyección (Spradling and Rubin, 1982). Se obtuvieron 5 líneas transgénicas independientes. Los resultados presentados en esta tesis fueron obtenidos con la línea; *bowlVP16*<sup>25E</sup> correspondiente a una inserción del transgen en el cromosoma 2 y que fue seleccionada por dar un fenotipo más fuerte en la mosca adulta.

## 1.3.- Análisis clonal.

### 1.3.1.- Clones de falta de función.

Para la generación de clones de falta de función se utilizó el sistema FRT/ Flipasas descrito por Golic (Golic, 1991) y Xu y Rubin (Xu and Rubin, 1993). Este método se basa en la recombinación entre secuencias FRT (del inglés *Flipase Recombination Target*), en presencia de la enzima recombinasa Flipasa (FLP), la cual se encuentra bajo el control de un promotor inducible por choque térmico a 37°C.

Para inducir los clones por recombinación mitótica de falta de función de *lines*, las larvas entre 0-24 horas, 24-48 horas, 48-72 horas y 72-96 horas después de la puesta del huevo, se incubaron a 37°C durante 30 minutos, y posteriormente se dejaron desarrollar hasta el 3<sup>er</sup> estadio larvario. Los genotipos de las moscas fueron:

*hsFLP1.22/+; FRT 42D armLacZ/ CyO* X *hsFLP1.22/+; FRT42D lin<sup>G1</sup>/CyO*  
*hsFLP1.22/+; FRT 42D Ubi-GFP/ CyO* X *hsFLP1.22/+; FRT42D lin<sup>G1</sup>/CyO*  
*f<sup>36</sup> hsFLP1.22/+; FRT 42D sha(f<sup>6</sup>)/ CyO* X *hsFLP1.22/+; FRT42D lin<sup>G1</sup>/CyO*

Los clones *bowl*<sup>2</sup> se generaron mediante un choque térmico a 37°C durante 45 minutos, en larvas de 48-72 horas DEH y se dejaron desarrollar hasta el 3<sup>er</sup> estadio larvario. Los genotipos de las moscas empleados fueron:

*hsFLP1.22/+; FRT 40A Ubi-GFP/ CyO* X *hsFLP1.22/+; FRT40Abowl<sup>2</sup>/CyO*

Los clones de células mutantes en el disco imaginal se reconocen por la falta de expresión de la proteína GFP o de  $\beta$ -Galactosidasa, dependiendo de los cromosomas marcadores utilizados. Los clones de células mutantes para *lines* en el adulto se distinguieron por el marcador cuticular *forked* que produce una morfología característica en tricomas y quetas.

## 1.3.2.- Expresión ectópica de genes usando el sistema GAL4/UAS.

Para estudiar la expresión ectópica de un gen determinado se emplearon dos métodos, ambos basados en el sistema GAL4/UAS (Brand and Perrimon, 1993).

Expresión ectópica dirigida. La expresión del gen de interés está bajo el control de una secuencia UAS que son específicas para la unión del activador transcripcional de levaduras Gal4. La expresión ectópica del gen depende del patrón de expresión de la línea Gal 4 utilizada. Las líneas Gal4 empleadas fueron: *ap-Gal4* (Calleja et al., 1996), *sd-Gal4* (Mullor et al., 1997), *MS209-Gal4* (Capdevila and Guerrero, 1994) que reproduce el patrón del gen *zfh-2* y *Ubx-Gal4* (Pallavi and Shashidhara, 2003).

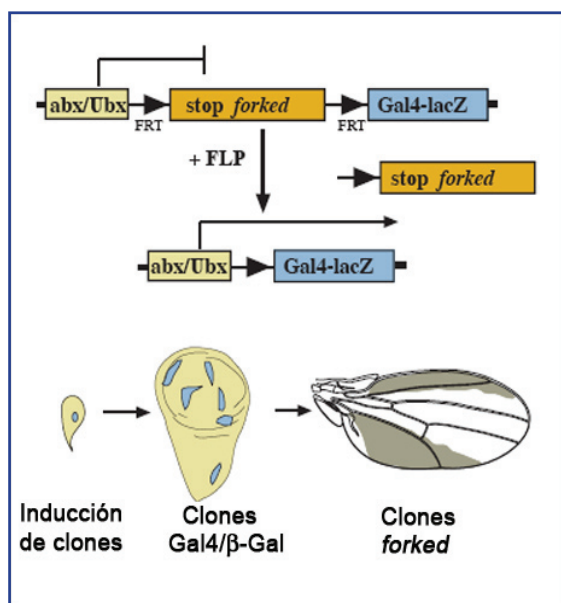
Clones de expresión ectópica: Para inducir clones de expresión ectópica se utilizó una combinación de los sistemas GAL4/UAS y FRT/FLP (de Celis and Bray, 1997). Los clones se indujeron mediante la incubación de las larvas, de entre 48-72 horas, a un choque térmico a 37°C durante 10 minutos. El genotipo de las moscas empleado para la generación de estos clones fue:

*f<sup>36a</sup> hs-FLP 1.22; abx/Ubx<FRT f<sup>+</sup> stop FRT> GAL4 LacZ /CyO wg LacZ*

X

UAS X, (siendo X uno o varios genotipos de la tabla MM.1)

En el sistema combinado, el gen dicistrónico GAL4 lacZ (en el que las regiones codificantes de Gal4 y lacZ están separadas por secuencias IRES) se coloca bajo el promotor *abx/Ubx* que se expresa de forma ubicua en el disco de ala, pero separados el uno del otro por una secuencia espaciadora flanqueada por dos secuencias FRT. De este modo, el gen GAL4 sólo se expresará en aquellas células que mediante la actividad “Flipasa” induzcan la recombinación entre las FRTs, eliminando así la secuencia espaciadora y acercando la caja promotora *abx/Ubx* al gen dicistrónico GAL4 lacZ. Por tanto, si colocamos el gen de interés bajo el control de las secuencias UAS se puede inducir su expresión en clones en distintos lugares del disco imaginal. Los clones en disco imaginal se detectaron por la expresión de la proteína β-Gal, detectable con el anticuerpo anti-β-Gal. Los clones en los individuos adultos se identificaron, por la presencia de células mutantes *forked*, ya que las células donde se produce la recombinación pierden el gen *forked<sup>+</sup>* que se encuentra entre las secuencias FRTs (de Celis et al., 1997) (Figura MM.1).



**Figura MM.I.- Generación de clones de expresión ectópica.**

Representación esquemática de cómo se generan clones de expresión ectópica utilizando la construcción que permite marcar células que expresan Gal 4 y LacZ con la mutación cuticular forked-

### 1.3.3.- Clones de recombinación mitótica generados por la técnica MARCM.

Para generar clones defalca de función de un gen y simultáneamente sobreexpresar otro gen diferente en las mismas células, se empleó la técnica MARCM (del inglés *Mosaic Analysis with a Represible Cell Marker*) (Lee and Luo, 1999). Esta técnica se basa en la capacidad represora de la molécula Gal80 impidiendo la unión del factor Gal4 a su dominio de unión. La técnica MARCM surge de la combinación de las técnicas FRT/FLP y UAS/GAL4. Tras la recombinación y posterior mitosis las células mutantes del clon eliminan la expresión de Gal 80, y por tanto son capaces a su vez de expresar otro gen que se encuentra bajo el control de secuencias UAS. De este modo se generaron clones MARCM utilizando los siguientes genotipos:

♀*yw FLP tubGal4 UAS-GFP; FRT42D Gal80/CyO* X:

♂ *UAS-arm<sup>S10</sup>; FRT42 lin<sup>G1</sup>/CyO*

♂ *yw; FRT42 lin<sup>G1</sup>/CyO; UAS-DNraf<sup>β.1</sup>*

♂ *yw; FRT42 lin<sup>G1</sup>/CyO; UAS-hairless*

♂ *yw; FRT42 lin<sup>G1</sup>/CyO; UAS-gro*

♀*yw FLP tubGal4 UAS-GFP; FRT40A Gal80/CyO* X

♂ *yw; FRT40 bowl<sup>2</sup>/CyO; UAS-drm*

En todos los casos las células mutantes se identificaron en el disco imaginal, por la presencia del marcador GFP.

### 1.3.4.-Expresión ectópica de genes controlada temporalmente.

La expresión temporal del transgen *UAS-drm* fue controlada mediante la proteína Gal80 termosensible (Gal80<sup>ts</sup>), que permite inducir la expresión de genes bajo el control del Gal4 de forma dependiente de la temperatura. Para la generación de estos clones se emplearon moscas con los fenotipos:

♀ *f<sup>6a</sup> hs-FLP 1.22; abx/Ubx<FRT f<sup>+</sup> stop FRT> GAL4 lacZ /CyO*

X

♂ *yw; tub Gal80ts; UAS- drm*

En condiciones de temperatura permisiva (17°C) la proteína Gal80 se expresa e impide que la proteína Gal4 active la expresión de Drm. En condiciones restrictivas (29°C), la proteína Gal80 no es funcional y permite que la proteína Gal4 active la expresión de Drm, vía el transgen *UAS-drm*.

### 1.4.- Inmunohistoquímica de los discos imaginales.

Con el empleo de esta técnica se detecta la proteína codificada por un gen mediante la incubación con anticuerpos específicos (primarios), que a su vez, serán detectados con ayuda de anticuerpos que reconocen su cadena pesada de las inmunoglobulinas (secundarios).

Las larvas de estadio 3, se disectaron en PBS y se fijaron durante 20 minutos en 4% Paraformaldehído (PF) en PBS. Se lavaron tres veces durante 15 minutos en PBT (PBS + 0,3 % Tritón X-100); posteriormente se bloquearon en PBT-BSA durante 30 minutos. Los discos se incubaron durante toda la noche a 4°C con el/los anticuerpos primarios en PBT-BSA. Después de varios lavados con PBT durante 45 minutos, se incubaron con los anticuerpos secundarios, conjugados con distintos fluoróforos diluidos en PBT durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Tras los lavados los discos se montaron en medio de montaje especial para fluorescencia (Citifluor).

**Tabla MM.2.- Anticuerpos primarios inmunohistoquímica**

Anti-	Animal	Dilución	Procedencia
<b>Bab</b>	rata	1/1000	(Godt et al., 1993)
<b>β-Gal</b>	conejo	1/1000	Jackson laboratories
<b>β-Gal</b>	ratón	1/100	Promega
<b>Bowl</b>	conejo	1/20	(de Celis Ibeas and Bray, 2003)
<b>Caspasa-3</b>	conejo	1/50	Hybridoma Bank
<b>Cut</b>	ratón	1/100	Hybridoma Bank
<b>Dac</b>	ratón	1/10	(Mardon et al., 1994)
<b>Dll</b>	conejo	1/200	(Vachon et al., 1992)
<b>GFP</b>	conejo	1/1000	Molecular Probes
<b>GFP</b>	ratón	1/1000	Roche
<b>Hth</b>	cobaya	1/100	(Aldaz et al., 2005)
<b>Iro-C</b>	rata	1/50	(Diez del Corral et al., 1999)
<b>Lines</b>	cobaya	1/50	Generado en esta Tesis.
<b>MAPK-P</b>	raton	1/1000	Sigma
<b>Myc</b>	ratón	1/500	Roche

<b>Nub</b>	ratón	1/50	(Yeo et al., 1995)
<b>Sal</b>	rata	1/500	(Barrio et al., 1999)
<b>Sens</b>	cobaya	1/1000	(Nolo et al., 2000)
<b>STAT-P</b>	ratón	1/1000	Sigma
<b>STAT92E</b>	rata	1/20	Cedido por Aurel Betz
<b>Tsh</b>		1/1000	(Gallet et al., 1998)
<b>Vg</b>	conejo	1/100	(Kim et al., 1996)
<b>Wg</b>	ratón	1/50	Hybridoma Bank
<b>Zfh-2</b>	rata	1/250	(Whitworth and Russell, 2003)

Tabla MM.3.- Anticuerpos secundarios

Anti-	Dilución.	Procedencia
<b>Ratón-FITC</b>	1:200	Jackson laboratories
<b>Conejo-FITC</b>	1:200	Jackson laboratories
<b>Rata-FITC</b>	1:200	Jackson laboratories
<b>Cobaya-FITC</b>	1:200	Jackson laboratories
<b>Ratón-TxRed</b>	1:200	Jackson laboratories
<b>Conejo-TxRed</b>	1:200	Jackson laboratories
<b>Rata-TxRed</b>	1:200	Jackson laboratories
<b>Cobaya-TxRed</b>	1:200	Jackson laboratories
<b>Cy5</b>	1:200	Jackson laboratories

### 1.5.- Hibridaciones *in situ*.

Esta técnica se basa en la detección del ARNm directamente en el tejido en el que se expresa (Tautz and Pfeifle, 1989). Para ello se sintetizaron “sondas” de ARN específicas que hibridan con el ARNm del gen que queremos analizar. Algunos de los nucleótidos empleados para la síntesis de la sonda, están marcados con DIG (digoxigenina; UTP-DIG) que se detecta con anticuerpos comerciales.

Las sondas para los genes *drm*, *bowl*, *lin*, *odd*, *sob* y CG7386 se generaron a partir de sus respectivos ADNc procedentes de BDGP, y se han marcaron con el kit DIG RNA Labeling de Roche.

Para analizar la expresión de estos genes, hemos realizado diferentes hibridaciones *in situ* tanto en discos imaginales de larvas silvestres, como en discos conteniendo clones de células mutantes para *lin<sup>G1</sup>*.

Tabla MM.4: Tamaños y restricciones de sondas.

cDNA de procedencia	Vector	Enzimas que linealizan el plásmido	Tamaño de la sonda	Polimerasa
<b>drm</b> CG 10016	pOT2	BstE II	2 Kb	T7
<b>odd</b> CG 3851	pFLC-1	Stu I	1,1 Kb	T3
<b>sob</b> CG 3242	pFLC-1	Sac I	1,2 Kb	T3
<b>bowl</b> CG 10021	pBS SK-	Xmc I	1 Kb	T7
<b>lines</b> PCR	pGEMT		1,6 Kb	SP6
CG7386	pOT2	SacII	965p.b	SP6

### 1.6.- Preparación de las cutículas del insecto adulto.

Las distintas estructuras disectadas de moscas adultas, fueron tratadas con KOH 10% a 100°C, deshidratadas en etanol absoluto y montadas en Euparal.

### 1.7.- Adquisición y tratamiento de imágenes.

Las imágenes de las cutículas de insecto adulto fueron tomadas con una cámara ccd acoplada a un microscopio vertical AxiosKop2 plus (Zeiss).

Las imágenes de los discos imaginales de ala están orientadas con la región ventral hacia arriba y la anterior hacia la izquierda, excepto si se indica lo contrario.

Para analizar los discos imaginales incubados con X-Gal o sondas marcadas con digoxigenina se utilizó óptica de Nomarski.

Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas mediante un sistema confocal Microradiance de Biorad acoplado a un microscopio vertical Zeiss AxiosKop2 (dos canales) y posteriormente tratadas con Adobe Photoshop

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS BIOQUÍMICOS.

### 2.1. Materiales y métodos básicos de manipulación de ADN.

Amplificación de ADN: Se llevo a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las reacciones se generaron utilizando la enzima Taq polimerasa (Biotools), empleando la temperatura de hibridación adecuada para cada par de oligos.

Digestión: Todas las digestiones se realizaron a 37°C en un volumen final que varia desde 10 µl a 50 µl y con 0.3-1,5 µl de Enzima de restricción durante al menos 2 horas. Las enzimas empleadas provienen de BioLabs y en algunos casos de los laboratorios TaKara.

Ligación: Las ligaciones se realizaron con la enzima T4 DNA Ligasa (New England BioLabs) a 18°C toda la noche, empleando una relación estequiométrica aproximada 3:1 (inserto: vector).

Análisis de digestión y PCR: se realizaron corriendo el ADN en geles de agarosa al 0,5% en TBE.

### 2.2. Generación de anticuerpos.

#### 2.2.1. Generación del anticuerpo Lines.

Con el fin de poder conocer la distribución de la proteína Lines, se generó un anticuerpo específico contra dicha proteína. Mediante PCR se amplificó un fragmento de 1.6 Kb correspondiente a la región codificante que genera un péptido de 60 Kdaltons. Para ello se

utilizaron los oligos:

- F 5' - **BamHI** lines- 5' TT **GGA TCC** GCG GCC GTG CAG AAG ATC CAC 3' que introduce un sitio de corte para la enzima BamH 1
- R- lines 3' **KpnI**- 5' **GGTACC** TCAGCT CAG CTC GTT GCC CTC 3', que introduce un sitio de corte para el enzima KpnI.

El fragmento de PCR se subclonó en el vector de expresión pT7-7 con el cual se transformó la cepa de células de E.coli BL2 D3 por electroporación.

### Inducción de la proteína.

Se indujeron pre-inoculos de 25 ml de LB + Amp toda la noche, a partir de los que se inocularon cultivos de 250 ml que se dejaron crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 nm para inducir la proteína con IPTG 1mM. Tras 4 horas de inducción los sedimentos de los cultivos se recogieron por centrifugación (30 min a 15.000 rpm) y se resuspendieron en tampón LAE 3X.

### Purificación de la proteína

Las muestras se corrieron en geles de arcilamida/bis-acrilamida al 10%. La proteína se extrajo mediante electroelución de las bandas de acrilamida y se guardó en alícuotas de 300 µg.

### Inoculación de cobayas

Tres cobayas fueron inoculadas 5 veces con 300 µg de proteína cada vez, con periodos de descanso de 15 días. Tras el sangrado de los animales se obtuvo el suero por centrifugación de la sangre a 3000 rpm 15 min y el sobrenadante se guardó a -20°C añadiéndole azida 0,02%.

### **2.2.2. Generación del anticuerpo Drm.**

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 245 pb que corresponde a la región codificante de un transcrito de 81 aminoácidos (9 KD)

Los oligos utilizados en la PCR fueron:

- F-5' **BamHI** *drm*-5' **GGA TCC** GCT GTA ATG CGA ATC GAC AAC GAT GAC TGC 3' introduce un sitio de restricción para la enzima BamH1.
- R-*drm* 3' **Hind III**.-5' **AAGC TTA** TCG CCA AAC ACA CTG ACT ACA TCT GTG C 3' introduce un sitio de restricción para la enzima Hind III.

El producto de PCR se clonó en el vector pGEMT y posteriormente se subclonó en el sitio BamH1/Hind III del polilinker del vector pQ30E, inducible por IPTG y se transformaron células competentes M15 resistentes a Kanamicina.

### Inducción de la proteína

Se realizó siguiendo el mismo protocolo que el anterior.

### Purificación de la proteína

Las muestras se corrieron en geles de arcilamida/bis-acrilamida al 15%. La banda correspondiente a la proteína se pulverizó en nitrógeno líquido, y se hicieron alícuotas de 150 µg.



Para amplificar la secuencia del gen *VP16* se emplearon los oligos:

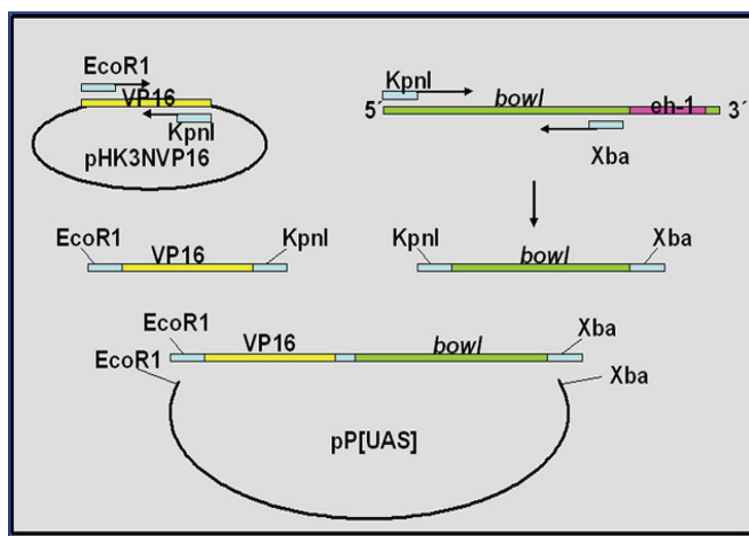
**F-5' *VP16* EcoR1**:-5' TAT GAA TTC ACC ACC ATG GCC GAT GTC AGC CTG GGG GAC 3'. Introduce un sitio EcoR1 en el extremo 5' del gen *VP16* para su posterior clonaje en el vector pUAS.

**R-*VP16* 3' KpnI**:- 5' AGT CAC GGT ACC ACC ACC ATG GCC GAT GTC AGC CTG GGG GAC 3'. Introduce un sitio KpnI en el extremo 3' de la secuencia de *VP16*

Con estos oligos y mediante PCR se amplificaron tanto el cDNA de *bowI*, eliminando de su secuencia el motivo eh-1 en 3', como la secuencia viral *VP-16* presente en el vector pHK3NVP16. Tras purificar los productos de PCR, estos se digirieron con las enzimas KpnI/ Xba en el caso de *bowI* y con EcoR1/KpnI en el de *VP16*.

A la vez se digirió el vector pUAS con las enzimas EcoR1/ Xba, cuyas dianas de restricción se encuentran en el sitio de policlonaje del vector. La estrategia de clonaje se esquematiza en la figura MM. 2.

Con el producto de las digestiones, se llevaron a cabo ligaciones múltiples con las que transformó una cepa de células competentes. Tras la transformación y posterior siembra en placa, se seleccionaron las colonias positivas y se realizó un análisis de restricción.



**Figura MM.2. Estrategia de clonaje de *bowI*Δ*eh-1*-VP-16.**

Se amplificaron las secuencias correspondientes a *VP16* y *bowI*, eliminando el motivo *eh-1*, tras lo cual se ligaron e insertaron en el vector pUAS.



## Inoculación de ratas

Dos ratas fueron inoculadas 5 veces con 150 µg de proteína cada vez, con periodos de descanso de 15 días, tras lo cual se sangró a los animales y se obtuvo el suero. Con el suero se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior.

## 2.3. Construcción de plásmidos.

### 2.3.1.-pUAS *lines*-GFP.

El ADNc del gen *lines* se obtuvo mediante PCR usando como molde el clon LD 43682 de la colección del BDGP. Para la PCR se utilizaron oligos que contienen las secuencias de inicio (Forward) y finalización (Reverse) de la transcripción. Se diseñaron de forma que se respete el marco de lectura de la proteína GFP en el extremo N terminal del vector pUAS GFP N::: Además, se diseñaron oligos que contuvieran secuencias diana de las enzimas de restricción necesarias para su clonaje en dicho vector.

Oligos utilizados para PCR de *lines*:

**F 5' Bgl II *lines*:** 5' AG ACC AGA TCT ATG GAC ACC TCA TCC AAG C 3'

**R *lines* 3' Not I:** 5' T ATT GCG GCC CGC TAG TTT CTC CTA TTC C 3'

El producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa al 0,5% y se extrajo el ADN de la banda mediante una purificación en columna, se precipitó para concentrar la muestra y se digirió con las enzimas BglII /Not I. Finalmente se clonó en el vector pUAS GFP N::: digerido con las mismas enzimas. Tras la transformación y posterior siembra en placa, se seleccionaron las colonias positivas, que se analizaron mediante un análisis de restricción.

### 2.3.2.-pUAS *bowl*Δeh-1-VP16.

La proteína Bowl actúa presuntamente como co-represor debido su capacidad de unión al represor Gro a través del motivo eh-1 presente en el extremo Ct. Con el fin de estudiar el comportamiento de Bowl, realizamos una construcción de Bowl a la que se le sustituyó el dominio eh-1 por la secuencia viral VP-16, que actuará como un activador transcripcional constitutivo. Comparando el efecto de las proteínas Bowl y Bowl Δeh-1-VP16 podremos determinar si realmente Bowl silvestre tiene actividad represora o activadora transcripcional. Para amplificar la secuencia del gen *bowl* se diseñaron los oligos:

**F-5' *bowl* KpnI-:** 5' TTC GGT ACC ATG CCC ACG GAA AGC TCA TCC 3' Introduce un sitio KpnI y además está en fase de lectura con la proteína viral VP16 insertada en el vector pHK3NVP16.

**R-*bowl* 3' Xba-:** 5' T ATA TCT AGA TTA CGG TGC AGG CGG TGG TGC TAT 3'. Introduce un sitio Xba y además elimina de la secuencia el motivo eh-1 de unión a Gro.

## 2.4.-Construcción de vectores con secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción Odd.

Con el fin de estudiar *in vitro* la capacidad de unión a ADN de los miembros de la familia Odd-skipped así como su actividad represora y/o activadora transcripcional, se generó un vector con múltiples copias del motivo de unión a Odd, el cual hemos denominado Odd-Binding-Site (OBS), dicha secuencia se encuentra presente en diversos genes. Las secuencias OBS, se clonaron en la región promotora del vector pGL3 MIN, que contiene la secuencia codificante del gen reportero luciferasa.

Para ello, se generaron oligos que contenían la secuencia completa OBS y además introducían en los extremos 5' y 3' dianas de restricción para las enzimas Asp718 y Bsiw1, que generan extremos romos capaces de alinear entre sí creando un sitio que no puede ser digerido por ninguna de las dos enzimas. Los oligos diseñados fueron:

**F 5' OBS Asp718: 5'gtacctgGCTACTGTCTgccacc 3'**

**R OBS 3' Bsiw1: 5'gtacgggtggcaGACAGTAGCcag 3'**

Se utilizó el siguiente protocolo:

### 1. Kinasa y anillamiento de oligos

Se añadieron 500 pmoles de cada oligo en un mismo tubo con:

- 5 µl de Tampón Kinasa 10X
- 5 µl 10mMATP
- 2 µl de Kinasa
- 28 µl de H<sub>2</sub>O

La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora.

Se sometió a un choque térmico (90°C) durante 5 min, tras el cual se dejó enfriar lentamente durante varias horas.

### 2. Ligación de los oligos:

Se tomaron 19 µl de la mezcla anterior y se le añadió 1 µl de la enzima DNA ligasa, incubándose la reacción a temperatura ambiente durante 30 min. Pasado este tiempo, se inactivó la enzima a 65°C durante 20 min.

### 3. Digestiones:

Se tomaron 5 µl y se digirieron en un volumen final de 20 µl con 0,5 µl de las enzimas BsiW1 y Asp718 durante 3 horas.

Las muestras se corrieron en un gel de arcilamida al 10% en condiciones nativas. Se seleccionaron las bandas correspondientes a 3 o 4 veces el tamaño de OBS y se eluyeron del gel en un tampón de elucción (tabla MM.5) a 37°C durante toda la noche.

Posteriormente los fragmentos OBS se precipitaron y fueron clonados en el vector pGL3 MIN previamente digerido con las enzimas BsiW1/Asp718.

Tabla MM.5 . Tampón elución	
0,5 M	NH <sub>4</sub> Ac
10 mM	Mg <sup>2+</sup> Cl <sub>2</sub>
1 mM	EDTA
0,1%	SDS

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS DE CULTIVOS CELULARES.

### 3.1. Líneas celulares.

Para los ensayos de transfección se empleó la línea celular Schneider (S2) derivada de tejido imaginal de *Drosophila*. Para su propagación y mantenimiento las células se crecieron en un medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (Sigma), aminoácidos no esenciales, glutamina y antibióticos a 37°C en un incubador que contenía el 7% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2 Métodos de transfección.

Para la transfección de las células S2 se utilizó el reactivo FuGene 6 (Invitrogen™). Se sembró un número de células suficiente para obtener un 80% de confluencia en el momento de transfectar en un medio DMEM carente de antibióticos. La mezcla de ADN (ver Tabla MM.6) diluida en medio Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, se mezcló con el reactivo Fugene6 en una relación 1: 2,5. En el momento de añadir a las células el complejo ADN-FuGene6, se

Tabla MM.6.- Mezcla de ADN		X
<b>Vector</b>	<b>Concentración total 2 µg</b>	<i>pUAS-bowlFLAG</i>
pUAS-X	0,5-1 µg (X cada uno)	<i>pUAS-drmHA</i>
pUAS-GFP	0.5 µg	<i>pUAS-oddHA</i>
Gal4	300 ng	<i>pUAS-sobHA</i>
pUAS (vacío)	Hasta completar 2 µg	<i>pUAS-linesGFP</i>

cambió el medio DMEM por Opti-MEM. A las 6 horas de la transfección se añadió medio DMEM suplementado al cultivo. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C y con 7% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, tras las cuales se indujo la expresión de proteína, mediante la adición de 2 mM de CuSO<sub>4</sub>. Pasadas 24 horas tras la inducción se recogieron las células para su posterior ensayo.

### 3.3. Detección de proteínas inducidas.

#### 3.3.1. Ensayos de inmunoprecipitación.

Se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación para estudiar las posibles interacciones proteína-proteína.

Se recogieron las células transfectadas, se lavaron con PBS y se lisaron en 500 µl de medio RIPA que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas.

Los pasos posteriores se realizaron en hielo.

- Las células se sonicaron y se centrifugaron para recoger el sobrenadante que contenía los extractos proteicos.

- A los sobrenadantes se les añadieron 5 µl de proteína G Sepharosa, y se dejaron en movimiento media hora para pre-lavar la mezcla. Se centrifugaron y se recogieron los sobrenadantes limpios.

- Los sobrenadantes se incubaron con 2 µl de los anticuerpos primarios correspondientes para cada IP, la incubación se realizó a 4°C en movimiento 1 hora. Así, el anticuerpo primario se unirá a la proteína específica, la cual puede estar formando complejo con otras proteínas que serán también purificadas en el proceso y podrán ser detectadas posteriormente mediante Western blot.

- Se añadieron 20 µl de proteína G que se une a la cadena ligera de los anticuerpos, y se dejaron toda la noche en movimiento a 4°C. En este paso, la proteína unida al anticuerpo primario, se une a las bolitas de Sepharosa.

- Se purificó la proteína-anticuerpo mediante centrifugación. Los sedimentos contienen la matriz de proteína G, a la que se encuentra unida la proteína y el anticuerpo. Tras lavar 2 veces en medio RIPA- Pi, se añadió 22 µl de Loading Buffer con 10% de β-Mercaptoethanol.

- Las muestras se calentaron a 100°C en el Thermo-Block durante 3 min, tras los cuales se mantuvieron en hielo y se centrifugaron para separar las proteínas de la matriz de Sepharosa.

- Los sobrenadantes que contenían la mezcla de proteínas se recogieron y se analizaron mediante Western Blot

#### 3.3.2. Análisis mediante Western Blot.

Con el empleo de esta técnica se realizaron estudios de estabilidad de la proteína Bowl cotransfectada con distintos miembros de la familia Odd-Skipped, en ausencia y/o presencia de Lines. La eficiencia de las transfecciones se normalizó mediante la co-transfección con el vector que expresa la proteína GFP. La utilización de esta técnica también nos permitió analizar las posibles interacciones proteína-proteína resultantes de las inmunoprecipitaciones.

Para el análisis por Western Blot se corrieron 15-20 µl de muestra en geles de poliacrilamida-SDS, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) mediante transferencia húmeda (BioRad). Las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura

ambiente en solución TBS-Tween 0,2%-leche 5%. Los anticuerpos primarios se utilizaron a las diluciones adecuadas según cada caso. La detección de cada proteína se realizó por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL (Amersham) y posterior auto-radiografía.

### 3.3.3. Tinción inmunohistoquímica de células.

Con el fin de estudiar la localización subcelular de Lines y de las proteínas de la familia Odd-Skipped, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas de las células en cultivo después de la transfección. Para ello, 24 horas después de la transfección, las células se crecieron sobre

Tabla MM.7.- Anticuerpos primarios utilizados en WB , IP e IH

Anticuerpo 1º	Especie	Concentración		Casa comercial
		WB	IPy IH	
Anti-Flag	ratón	1/1000	1/200	Sigma
Anti- HA	ratón	1/2000	1/200	Sigma
Anti-GFP	conejo	1/2500	1/250	Molecular probes
Anti-GFP	ratón	1/1000	1/100	Roche

Tabla MM.8.- Anticuerpos secundarios utilizados en WB

Anticuerpo 2º	Concentración	Casa comercial
Anti-Ig ratón HRP	1/5000 (WB)	Amersham
Anti-Ig conejo HRP	1/5000 (WB)	Amersham
Anti-ratón-FITC	1/200 (IH)	Jackson
Anti-ratón- TxRed	1/200 (IH)	Jackson

objetos durante 30 min para su adhesión al vidrio. Tras los cuales. Se fijaron en PFA 4% (20 min), y se lavaron 3 veces (5 min) en PBS y en PBT (PBS+ 0,1% Tritón). Se bloquearon a 4°C toda la noche con agitación suave en una solución PBT+ BSA 1% y se incubaron con el/los anticuerpos primarios durante 1 hora, tras la cual se lavaron 3 veces en PBS. Posteriormente las células se incubaron 1 hora con los anticuerpos secundarios. Tras varios lavados finales en PBS las células se montaron en un medio especial para fluorescencia (Citifluor).

Los anticuerpos utilizados para Western Blot (WB), inmunoprecipitaciones (IP) e inmunohistoquímica (IH), quedan resumidos en las siguientes tablas:

### 3.4 Ensayos de Luciferasa.

Este ensayo permite estudiar la capacidad de unión a ADN de las proteínas estudiadas, así como comparar la actividad transcripcional de la proteína de Bowl silvestre frente a la forma constitutivamente activadora resultante del híbrido Bowl- $\Delta$ eh1-VP16.

### **3.4.1.-Transfección de células.**

Las células de *Drosophila* S2 se transfectaron con  $\text{CaCl}_2$  2M.

Para este ensayo se realizó una mezcla que contenía 0,6  $\mu\text{g}$  del vector p MIN-OBS-luciferasa mas 0,2  $\mu\text{g}$  del vector Renilla luciferase (Promega); este último sirve para normalizar la medida de la actividad luciferasa.

Esta mezcla se añadió a la mezcla de ADN a ensayar en cada caso, empleando un máximo de 2  $\mu\text{g}$  de DNA para cada transfección. Además, se le añadió 7,8  $\mu\text{l}$  de 2M  $\text{CaCl}_2$  que se llevaron a un volumen total de 62,5  $\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O}$ . Posteriormente se le añadió un volumen de 62,5  $\mu\text{l}$  de medio 2XHBS y se agitó durante 10 seg.

Se retiró el medio de cultivo a las células y se les añadió gota a gota el medio que contenía la mezcla de ADN y  $\text{CaCl}_2$  más 1 ml de medio fresco.

### **3.4.2.-Medida de la actividad luciferasa.**

La expresión de la proteína se indujo con 2 mM de  $\text{CuSO}_4$  24 horas después de la transfección. Al tercer día, se prepararon los extractos y se midió la actividad luciferasa utilizando el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega).

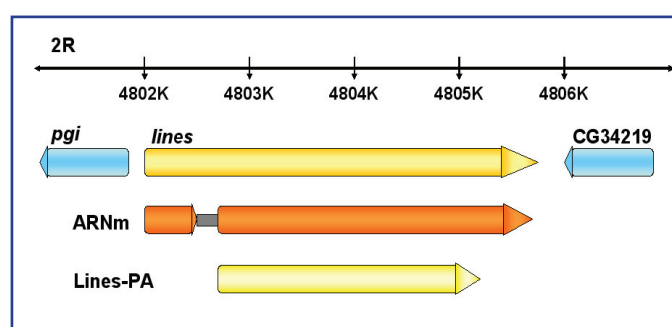
Resultados



## 1.-ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *lines* DURANTE EL DESARROLLO IMAGINAL DE *DROSOPHILA*.

### 1.1.- Patrón de expresión del gen *lines* durante el desarrollo imaginal

El ARNm de *lines* es de 3,6 Kb y codifica para una única proteína de 858 aminoácidos (Figura R.1). En el embrión, *lines* se expresa de manera ubicua a bajos niveles en la epidermis y a altos niveles en el intestino anterior y posterior así como en el mesodermo. La función de *lines* ha sido estudiada en este contexto, donde se ha descrito su papel en la especificación de las células de la cutícula embrionaria y en la formación del intestino, mediando las respuestas a diferentes vías de señalización (Hatini et al., 2000).



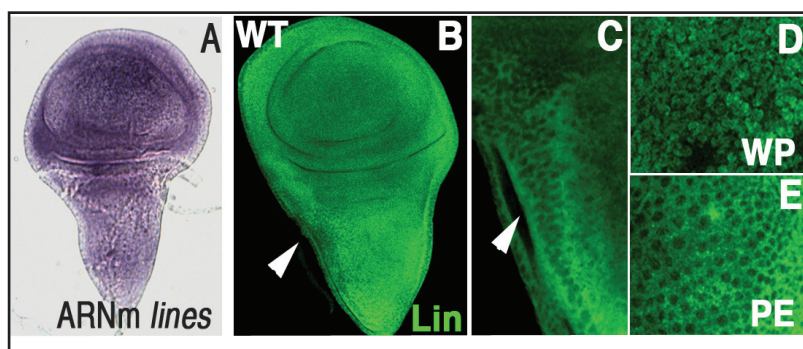
**Figura R.1. Mapa citogenético de lines.**

El gen *lines* se localiza en el brazo derecho del cromosoma 2 de *Drosophila*, en la región 44F6-44F7 flanqueado por los genes *phosphoglucose isomerase* (*pgi*) y *baboon* (*babo*). El mRNA de *lines* es de 3,6 Kb y codifica para una única proteína de 858 aminoácidos.

Para determinar el patrón de expresión de *lines* durante el desarrollo imaginal, se analizó la expresión del ARNm mediante hibridación *in situ*, y la distribución espacial de la proteína Lines mediante inmunohistoquímica, para lo cual se generó un anticuerpo (ver materiales y métodos).

La distribución del ARNm y de la proteína Lines es generalizada en todos los discos imaginales, sin embargo, la localización subcelular de la proteína varía. En el disco imaginal de ala, la proteína Lines se localiza de forma ubicua en el epitelio imaginal tanto en el núcleo como en el citoplasma, excepto en tres regiones donde la proteína Lines tiene una localización citoplásmica: una estrecha franja de 2-10 células a lo largo del borde más anterior de la región de notum, en las células escamosas de la membrana peripodial y en las células cuboidales en la región donde las células del epitelio del disco propio se unen con las células de la membrana peripodial (Figura R.2).



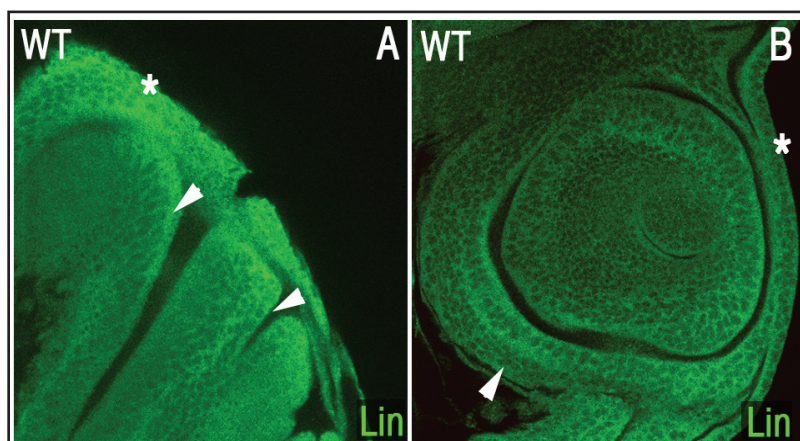


**Figura R.2. Patrón de expresión de Lines en el disco imaginal de ala.**

A) Expresión de ARNm de *lines*. El transcrito del gen *lines* se expresa de forma ubicua en el disco imaginal de ala. B-E) Expresión de la proteína Lines utilizando un anticuerpo específico anti-Lines (verde). Lines se

expresa de forma ubicua en el disco imaginal de ala (B). Su localización es citoplasmática en el borde anterior, mostrado por las puntas de flecha (B y C) y en las células de la membrana peripodial (en inglés *peripodial epithelium*, PE) (E). Localización nuclear de Lines en las células del ala (en inglés *wing pouch*, WP) (D).

En otros discos imaginales, como los de pata y ojo-antena, también hay expresión de Lines. En el disco de ojo-antena, la localización subcelular de Lines siempre es citoplásmica. En el disco de pata, Lines se expresa en el citoplasma en anillos concéntricos, que coinciden con las células que van a dar lugar a las articulaciones en la pata adulta, y en la membrana peripodial. Sin embargo, se localiza en el núcleo y en el citoplasma en el resto de las células de cada segmento (Figura R.3).



**Figura R.3. Patrón de expresión de Lines en los discos imaginales de pata y ojo-antena.**

A) Expresión de Lines en el disco imaginal de pata. B) Expresión de Lines en la región presuntiva de antena del disco imaginal de ojo-antena. En ambos discos imaginales, Lines se expresa de forma generalizada, su localización es citoplasmática tanto en las regiones que darán lugar a las articulaciones en el adulto, marcadas por puntas de flecha como en la membrana peripodial, marcada con un asterisco.

## 1.2.- Análisis clonal de la falta de función del gen *lines*.

La expresión de la proteína Lines en los discos imaginales sugiere una función durante la formación de estas estructuras. Para determinar esta función, se indujeron clones de recombinación mitótica mediante la técnica FRT/FLP utilizando el alelo nulo *lin<sup>G1</sup>* (Bokor and DiNardo, 1996). Los clones fueron inducidos en intervalos precisos del desarrollo, 0-24 horas, 24-48 horas y/o 48-72 horas después de la eclosión del huevo (DEH), momentos que coinciden con el primer, segundo y tercer estadio larvario, respectivamente.

El fenotipo de los clones *lin<sup>G1</sup>* fue analizado en la cutícula de individuos adultos y en los discos imaginales de los que derivan estas estructuras examinando las alteraciones en la expresión de diferentes marcadores genéticos.

### 1.2.1.-Fenotipo cuticular de falta de función de *lines* en el insecto adulto.

Para analizar qué alteraciones fenotípicas producen los clones *lin<sup>G1</sup>*, las células mutantes se identificaron en la cutícula del adulto utilizando el marcador de quetas y tricomas *forked* (*f*), mientras que las células de los clones gemelos se reconocen por la presencia del marcador *shavenoid* (*sha*).

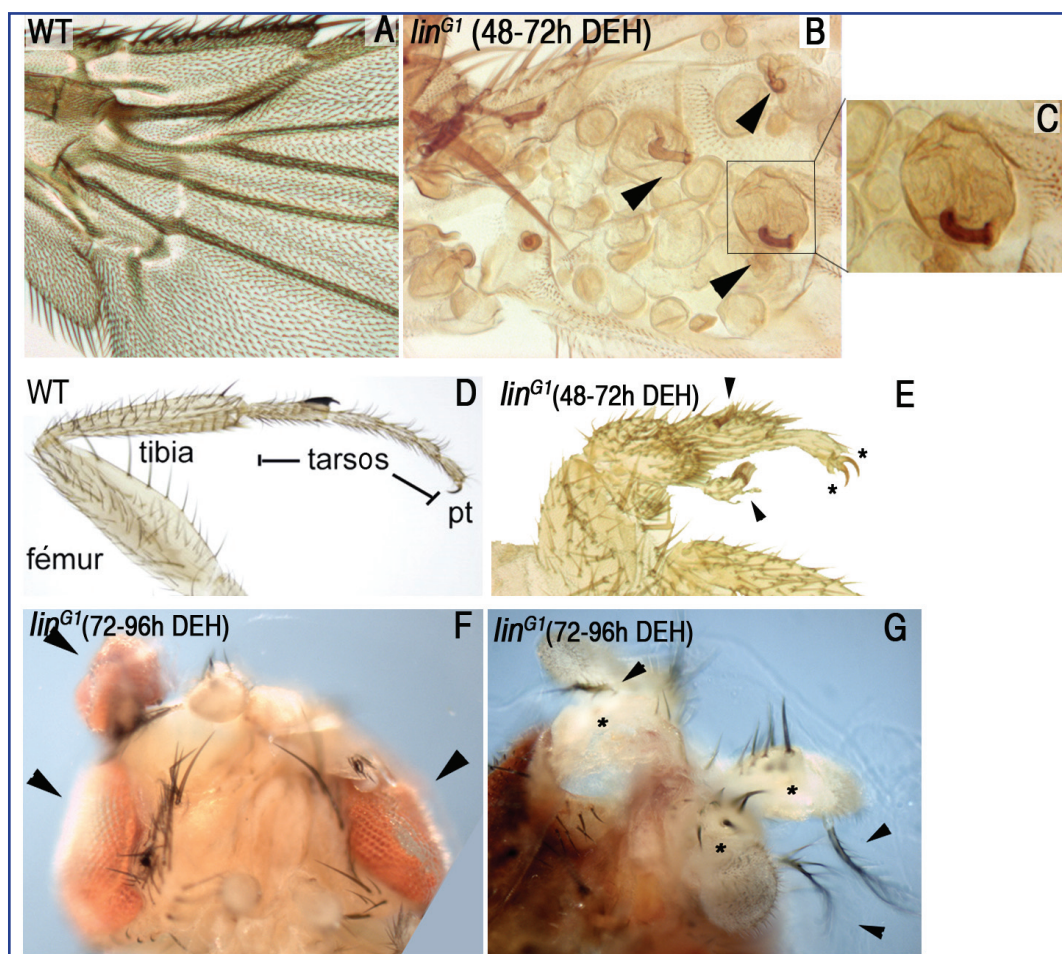
Cuando los clones recombinantes se produjeron entre 0-24 y entre 24-48 horas DEH, no se detectaron células *lin<sup>G1</sup>* en la cutícula de individuos adultos, lo que sugiere que estas células se mueren a lo largo del desarrollo larvario y/o pupal.

Cuando la recombinación mitótica se produjo entre 48-72 horas DEH se detectaron clones *lin<sup>G1</sup>* que mostraban alteraciones en la cutícula de los individuos adultos. En el ala, los clones *lin<sup>G1</sup>* provocan la formación de vesículas de tejido mutante situadas entre las superficies dorsal y ventral del ala, indicando que las células *lin<sup>G1</sup>* tienden a segregarse del tejido silvestre circundante. Además, el tejido mutante suele diferenciar órganos sensoriales (OS) que normalmente están situados en el margen anterior del ala, la pleura, el notum, y en otras estructuras cuticulares. Estos OS forman parte del sistema nervioso periférico adulto (SNP) y tienen un patrón estereotipado y reproducible en los individuos silvestres. La aparición de OS fuera de su posición normal sugiere un cambio de identidad en las células *lin<sup>G1</sup>*. En las patas, los clones *lin<sup>G1</sup>* además producen acortamiento de los tarsos y sobrecrecimientos tubulares de tamaño variable en forma de profusiones formadas exclusivamente por células *lin<sup>G1</sup>* que se excluyen del territorio silvestre (Figura R.4).

Los clones *lin<sup>G1</sup>* inducidos entre 72-96 horas DEH, producen duplicaciones de diferentes estructuras cuticulares dependiendo de su posición en el disco, tales como ala, notum, ojo y antena (Figura R.4). Estos fenotipos de duplicación son no autónomos, es decir, las estructuras duplicadas contienen células mutantes y células silvestres, como indica la presencia de células sin el marcador *f*, y que por tanto no son células *lin<sup>G1</sup>*.

Los fenotipos mutantes observados indican que la función del gen *lines* es necesaria para la formación de estas estructuras, tal y como sugería su expresión en los discos imaginales,

y además parece que su requerimiento espacio-temporal durante el desarrollo imaginal varía.



**Figura R.4. Fenotipo adulto de la falta de lines.**

**A)** Región proximal de ala silvestre. **B-C)** Región proximal de un ala conteniendo clones *linG1* generados entre 48-72h DEH. Los clones de tejido mutante quedan entre las superficies dorsal y ventral del ala formando vesículas. El tejido mutante está marcado por la presencia de quetas for-ked (puntas de flecha en la figura B). **C)** Imagen ampliada de un clon *linG1* en B. **D)** Pata adulta silvestre. **E)** Fenotipo de duplicación de estructuras y acortamiento de la pata adulta con clones *linG1*, generados entre 48-72h DEH. En la figura se marcan la duplicación del peine sexual (puntas de flecha) y de la uña (asteriscos). **F, G)** Duplicaciones de estructuras cuticulares, causadas por clones *linG1* generados entre 72-96h DEH. Duplicación de ojo marcada por puntas de flecha en la parte superior de la imagen (F). Duplicación de antena, las aristas están marcadas en la figura por asteriscos y el primer segmento antenal por puntas de flecha (G).

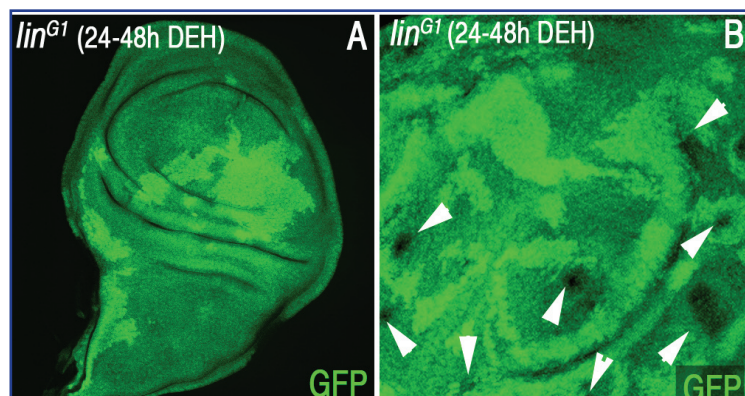
### 1.2.2.- Análisis en el disco imaginal de ala de los efectos producidos por clones de falta de función *lines*.

Para completar el estudio fenotípico del tejido adulto, se analizaron los clones *lin<sup>G1</sup>* en los discos imaginales. Las células mutantes se identificaron por la ausencia de los marcadores LacZ o GFP, según el genotipo empleado para la generación de los clones de recombinación mitótica.

Cuando los clones se generaron en los intervalos de 0-24 horas y 24-48 horas DEH,



las células mutantes no se detectan en los discos imaginales de tercer estadio, quedando sin embargo, como testigo de su existencia, las células del clon gemelo marcadas por la presencia de células LacZ o GFP homocigóticas. La falta de clones inducidos antes de las 48 horas DEH concuerda con la ausencia de tejido mutante observada en la cutícula adulta (Figura R.5). Asimismo, la ausencia de células *lin<sup>G1</sup>* sugiere que estas células se están muriendo o bien tienen una tasa de proliferación más baja que las células silvestres.

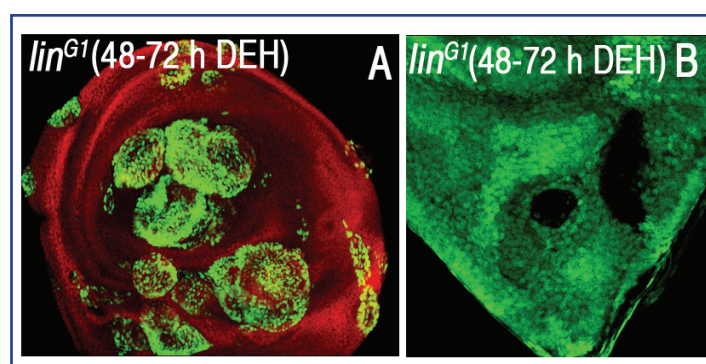


**Figura R.5. Clones *linG1* generados entre 24-48 h DEH en el disco imaginal de ala.**

**A y B)** Disco imaginal de ala con clones *linG1* inducidos durante el desarrollo temprano. Estos clones no sobreviven, sólo se observan los clones gemelos marcados con GFP (verde intenso en A). En algunos casos queda una marca donde el clon *lin* se originó (puntas de flecha) (B).

A diferencia de los clones tempranos, las células *lin<sup>G1</sup>*, en clones generados entre 48-72 horas DEH en el disco imaginal de ala, sobreviven y muestran las siguientes características:

- Un efecto sobre el crecimiento autónomo con una tasa proliferación elevada, como se pone de manifiesto por el mayor tamaño de los clones mutantes en comparación con los clones gemelos. Este incremento de proliferación es variable, resultando menor cuando los clones se localizan en el territorio de notum.
- Una morfología redondeada, que sugiere que las células mutantes tienden a minimizar al contacto con el tejido silvestre circundante (Figura R.6).

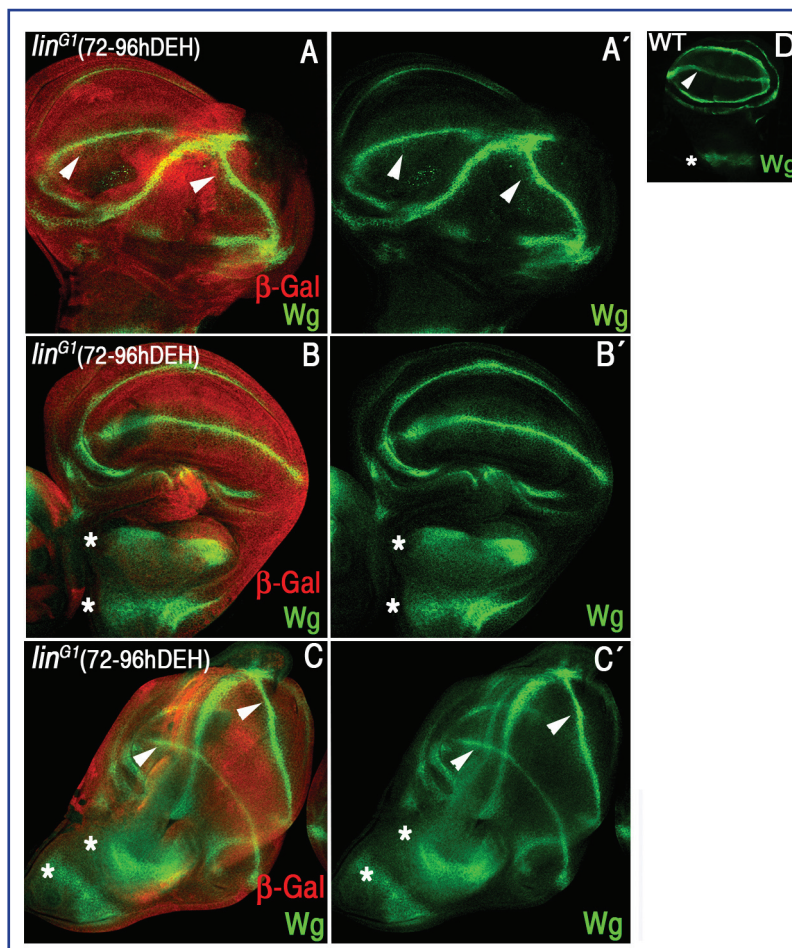


**Figura R.6. Clones *linG1* generados entre 48-72 h DEH en el disco imaginal de ala.**

**A y B)** Clones *linG1* inducidos entre 48-72 h DEH en el disco imaginal de ala, marcados por la presencia de GFP (verde). Clones *linG1* dentro del territorio del ala, presentan mayor tamaño (imagen tomada empleando aumento de 25X) (A), frente a los clones generados dentro del territorio presuntivo de notum (imagen tomada empleando un aumento de 25 y un zoom de 1.7) (B).

Estos fenotipos, junto al hecho de que el tejido mutante forme vesículas que se excluyen del tejido silvestre adulto y la presencia de OS ectópicos, sugieren que las células mutantes *lines* sufren un cambio de identidad celular y son excluidas del epitelio formado por las células silvestres vecinas.

Los clones *lin<sup>G1</sup>* generados entre 72-96 y/o 96-120 horas DEH producen un efecto sobre el crecimiento no-autónomo, es decir aparecen sobrecrecimientos que sobresalen del epitelio y que están constituidos en parte por células mutantes, y también por células silvestres. En el disco de ala, estos clones muestran además un comportamiento muy sorprendente, ya que generan una duplicación del territorio en función de la posición en la que aparecen a lo largo del eje P/D del disco. De este modo, si el clon *lin<sup>G1</sup>* se localiza en el territorio de ala próximo a la región del hinge, se produce una duplicación del ala. La figura R.7 ilustra un ejemplo de duplicación del territorio presuntivo de ala donde se observa la duplicación del borde D/V y de los anillos de expresión de Wg. Los clones *lin<sup>G1</sup>* situados en el territorio de notum cercano al hinge, producen duplicaciones de notum, como indica la presencia de dos dominios Wg en este territorio (Figura R.7B). Sorprendentemente, cuando el clon se encuentra situado entre



**Figura R.7.**  
**Duplicaciones producidas por clones *linG1* generados entre 72-96h DEH en el disco imaginal de ala.**

A-D) Expresión de Wg (verde) en el disco imaginal de ala de tercer estadio. Clones *linG1* inducidos (72-96h DEH) marcados por la ausencia de β-Gal (rojo) producen efectos no-autónomos en la proliferación y el patrón generándose duplicaciones de diferentes territorios dependiendo de donde se origine el clon. (A, A') Clon originado en el territorio de ala que genera un ala duplicada, como indica la expresión de Wg en dos bordes D/V, (puntas de flecha), y en los anillos externos. (B, B') Clon originado en el territorio de notum, genera un notum ectópico marcado por la expresión de un doble dominio de Wg (asteriscos). (C, C') Clon generado en la región hinge, da lugar a la duplicación de

un ala completa. La expresión de Wg muestra una duplicación del disco de ala completa, con dos bordes D/V (puntas de flecha) y dos dominios de expresión de Wg en el notum (asteriscos). (D) Expresión normal de Wg indicando el borde D/V (punta de flecha) y el notum (asterisco).

los territorios presuntivos de ala y notum produce una duplicación completa del disco de ala que contiene los territorios que van a dar lugar al ala, hinge y notum, como puede verse por la expresión de Wg en los dos discos imaginales que quedan superpuestos (Figura R.7C). Estas duplicaciones concuerdan con las duplicaciones cuticulares observadas en los adultos.

Los efectos no-autónomos tardíos, y los cambios de identidad tempranos, sugieren que diferentes vías de señalización claves en el desarrollo imaginal podrían estar alteradas en los clones *lin*<sup>G1</sup>. El tipo de fenotipo observado dependiendo del tiempo de inducción de los clones mutantes, muestra que la función de *lines* es dependiente del estadio del desarrollo del disco imaginal de ala.

La mayoría de los resultados experimentales presentados en este trabajo de tesis, se centran en el estudio funcional del gen *lines* durante el desarrollo imaginal del disco de ala. Concretamente, se han estudiado en detalle los efectos causados por la eliminación de la función de *lines* en clones inducidos entre 48-72 horas DEH, determinándose los cambios genéticos y morfológicos que se producen en las células mutantes así como las vías de señalización que pueden estar reguladas por la función del gen *lines* durante el desarrollo del disco imaginal de ala.

#### **1.2.2.1.- Cambio de identidad celular en células mutantes *lines*.**

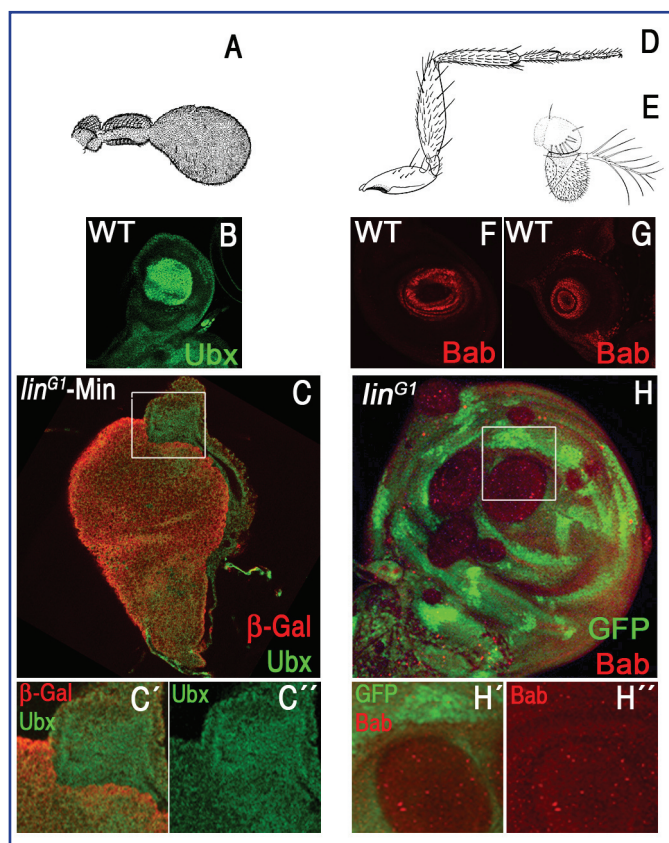
Durante el desarrollo embrionario *Lines*, funciona como un cofactor de la proteína homeótica Abdominal-B (Abd-B) (Castelli-Gair, 1998). Los cofactores que interactúan con las proteínas homeóticas contribuyen a especificar la identidad segmental a largo del eje A/P.

Algunos de los fenotipos *lin*<sup>G1</sup> observados en los individuos adultos, como la aparición de OS en posiciones ectópicas, o la exclusión de las células mutantes en vesículas, sugieren que las células *lin*<sup>G1</sup> podrían estar sufriendo un cambio de identidad. Por tanto, quisimos estudiar si estos fenotipos están provocados por la alteración en la expresión de genes que confieren identidad celular en el disco de ala.

La expresión de la proteína homeótica Ultrabitorax (Ubx) en el tercer segmento torácico embrionario hace que el disco imaginal especificado dentro de este territorio sea el de halterio. En el disco imaginal de ala, clones *lin*<sup>G1</sup> generados entre 48-72 horas DEH no producen ningún cambio en la expresión de Ubx, lo que indica que los fenotipos observados no son debidos a un cambio de identidad de ala a halterio (Figura R.8A-C)

Por otro lado, analizamos la expresión de los genes *bric-à-brac* (*bab*) y *dachshund* (*dac*), cuya expresión depende del gen homeótico *distal-less* (*dll*), que determina la identidad de los discos imaginales ventrales como los de pata y ojo-antena. En clones *lin*<sup>G1</sup> generados entre 48-72 horas DEH en el disco de ala, observamos que Bab y Dac no se expresan. Este resultado indica que la eliminación de la función de *lines* no produce un cambio de identidad de disco imaginal dorsal a ventral, al menos a los dominios que se definen por la expresión de estos genes (Figura R.8D-H).





**Figura R.8. Análisis de la expresión de genes de identidad de discos imaginales de halterio, pata y ojo-antena.**

**A)** Representación del halterio adulto. **B)** Expresión de Ubx (verde) en la región distal del disco imaginal de halterio. **C-C'')** Clones *linG1* inducidos en un fondo Minute, generados en el disco imaginal de ala, marcados por la ausencia de β-Gal (rojo), no expresan Ubx (verde). (C', C'') Detalle aumentado del clon del recuadro en C. **D y E)** Representación de la pata y antena adulta respectivamente. **F y G)** Expresión de la proteína Bab en los discos imaginales de pata y ojo-antena, donde Bab se expresa en la región presuntiva de antena. **H-H'')** Clones *linG1* generados en el disco imaginal de ala, marcados por la ausencia de GFP (verde) no expresan Bab (rojo). (H', H'') Detalle aumentado del clon del recuadro en H.

Los resultados descritos descartan que las alteraciones observadas en las células *linG1* sean debidas a un cambio de identidad del disco de ala en disco de halterio, pata u ojo-antena. Por lo tanto, el siguiente paso fue estudiar si las células *linG1* cambian su identidad dentro del disco de ala.

#### 1.2.2.2.- Estudio de la función de *lines* en la regulación de las vías de señalización implicadas en la morfogénesis del ala.

Descartado el cambio de identidad de las células mutantes *linG1* del disco de ala hacia otro tipo de disco imaginal, estudiamos si las células *linG1* reespecifican su identidad dentro disco de ala, ya que los fenotipos observados en los individuos adultos sugieren que los OS ectópicos podrían corresponder a los que se diferencian en territorios del ala más proximales (notum o pleura)

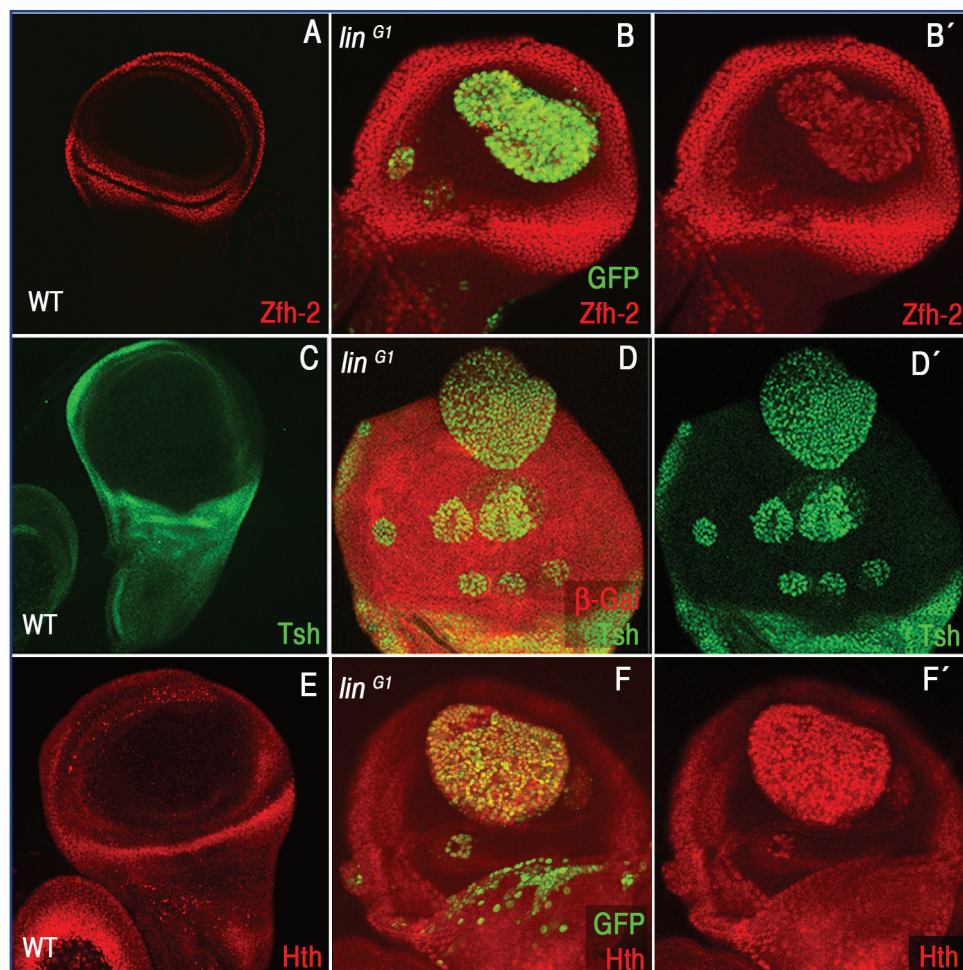
La acción combinada de los morfógenos Wg en el borde D/V y Dpp en el A/P da lugar a la activación de una respuesta que coordina el crecimiento y desarrollo del patrón morfogenético del ala en ambos ejes. Debido a que ambas funciones parecían estar afectadas en los clones de células mutantes *lines*, estudiamos en estas células las vías de señalización de Wg y Dpp. Estas dos proteínas difusibles activan la expresión de genes diana específicos en las células epiteliales del disco imaginal, dependiendo de los niveles de actividad de sus rutas de señalización en diferentes posiciones dentro del disco de ala.

***Análisis de la expresión de genes de respuesta a Wg en clones mutantes lines.***

En el disco imaginal de ala, la respuesta temporalmente dinámica a la señal de Wg dirige la especificación de territorios a lo largo del eje P/D. En el primer estadio larvario, las funciones antagónicas entre las vías de Wg y EGF-R son responsables de la subdivisión del disco en los primordios de ala y notum. Más tarde, la señal de EGF-R es necesaria para el mantenimiento de la identidad de las células del notum frente a las células del ala (Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002b). Esta es la primera manifestación en el disco de ala de la subdivisión a lo largo del eje P/D. En el segundo estadio larvario, Wg modula la expresión de genes implicados en el desarrollo del ala proximal como son *hth*, *tsh* y *zfh-2*. Finalmente, en el tercer estadio, la activación de Notch dirige la expresión de Wg en las células del borde D/V. La acción combinada de Notch y Wg induce la expresión de la proteína nuclear Vg. La expresión de Vg junto con la proteína Nub definen el territorio de ala en el dominio más distal, reprimiendo las expresiones de *tsh*, *zfh-2* o *hth*, que quedan confinadas al territorio más proximal del ala y el “hinge” (Whitworth and Russell, 2003).

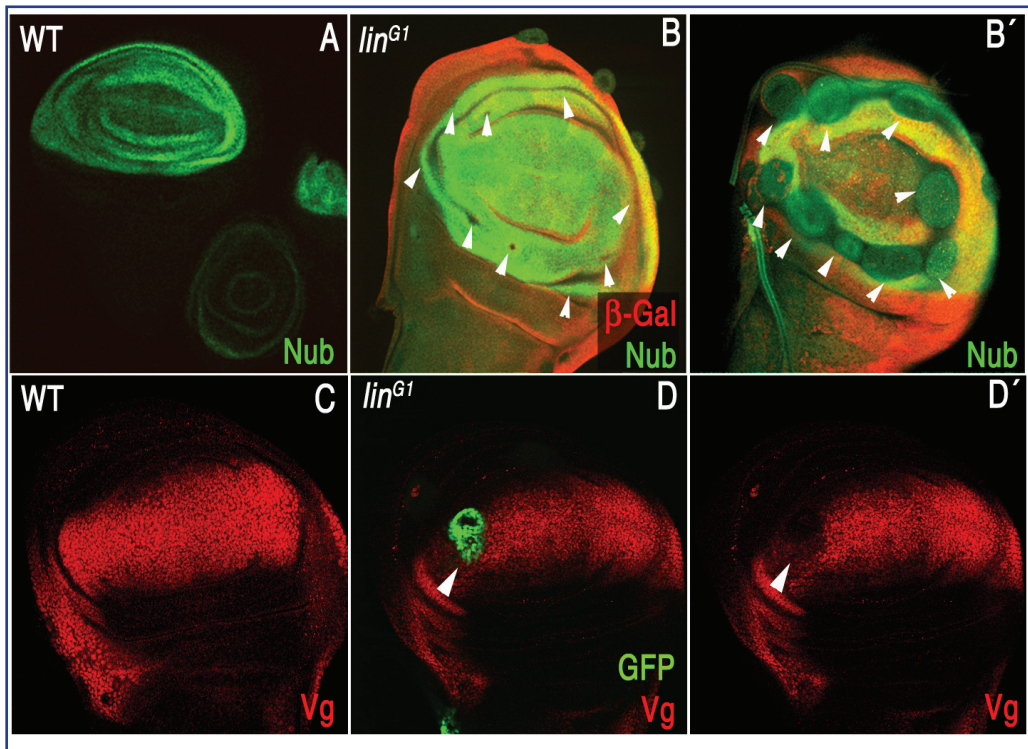
Los clones *lin*<sup>G1</sup> inducidos entre 48-72 horas DEH que están situados en la región más distal del disco de ala, expresan ectópicamente *Zfh-2*, *Tsh* y *Hth* (Figura R.9). Mientras que por otro lado, hemos observado que los clones *lin*<sup>G1</sup> situados dentro del territorio de ala eliminan la expresión de Vg y Nub (Figura R.10). Estos resultados indican que *lines* modifica la capacidad de respuesta celular frente a la señal de Wg, provocando una transformación de la identidad distal hacia proximal debido a la activación en células distales de genes propios de territorios más proximales dentro del disco de ala.





**Figura R.9. Clones *linG1* activan ectópicamente la expresión de marcadores proximales en el disco imaginal de ala.**

**A, C y E)** Expresión de los marcadores proximales Zfh-2, Tsh y Hth, respectivamente, en la región proximal del ala y hinde de un disco silvestre. **B, B')** Clones *linG1* marcados por la presencia de GFP (verde) expresan ectópicamente Zfh-2 (rojo). **D, D')** Clones *linG1* marcados por la ausencia de tinción β-Gal (rojo), expresan ectópicamente Tsh (verde). **F, F')** Clones *linG1* marcados por la presencia de GFP (verde) expresan ectópicamente Hth (rojo). Nótese que todos los clones *linG1* mostrados se localizan en la región más distal del disco de ala.



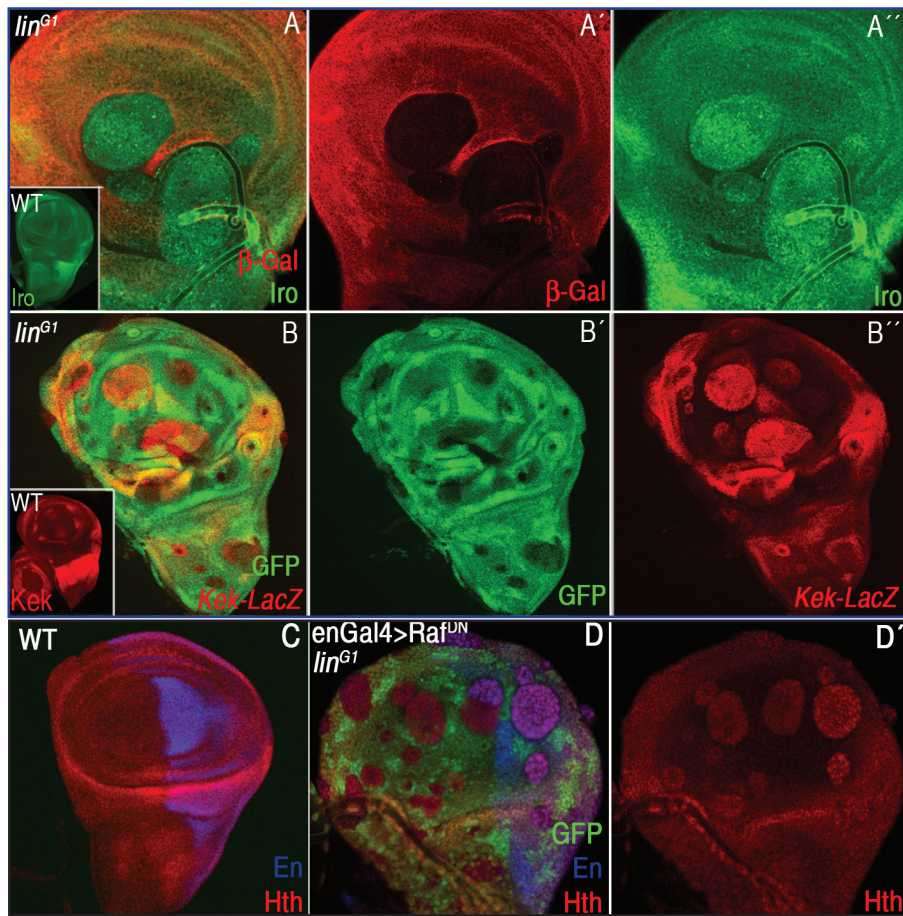
**Figura R.10. Clones *linG1* reprimen la expresión de marcadores distales en el disco imaginal de ala.**

**A y C)** Expresión de Nub y Vg respectivamente, en el disco de ala silvestre. **B, B')** Dos planos focales de un mismo disco imaginal, en (B) se muestra la expresión endógena de Nub y el origen de los clones *linG1* (puntas de flecha). Clones *linG1*, marcados por la ausencia de tinción  $\beta$ -Gal (rojo), no muestran expresión de Nub (verde) (B'). **D, D')** Clon *linG1* marcado por GFP (verde), donde se reprime la expresión de Vg (rojo).

Como la determinación de la identidad celular de notum depende inicialmente de la actividad de la vía EGF-R, estudiamos si la transformación de identidad distal a proximal podía deberse a la activación ectópica de la vía EGF-R en las células mutantes *lines*. Para ello estudiamos la expresión de diferentes dianas de la vía EGF-R en clones *linG1* situados en la región distal del disco de ala. Observamos que en estas células mutantes se activa ectópicamente la expresión de dos genes diana de EGF-R: Iro-C y Kekkón (Figura R.11A-B).



La falta de respuesta a la señal de Wg y la actividad ectópica de la vía EGF-R podrían indicar que la represión de la respuesta a Wg es consecuencia de la activación de la vía EGF-R. Para estudiar esta hipótesis, indujimos clones *lin<sup>G1</sup>* en todo el disco imaginal, y redujimos la actividad de la vía EGF-R sólo en la mitad posterior del disco, dirigiendo la expresión de una forma dominante negativa de Raf (UAS-*raf<sup>DN</sup>*) con la línea *en-Gal4*. Observamos que los clones *lin<sup>G1</sup>* en el dominio posterior mantienen la expresión ectópica del marcador proximal Hth, pese a la inactivación de la vía EGF-R (Figura R.11D), indicando que en las células *lin<sup>G1</sup>*, la represión de la actividad de la vía de Wg es independiente de la vía EGF-R.



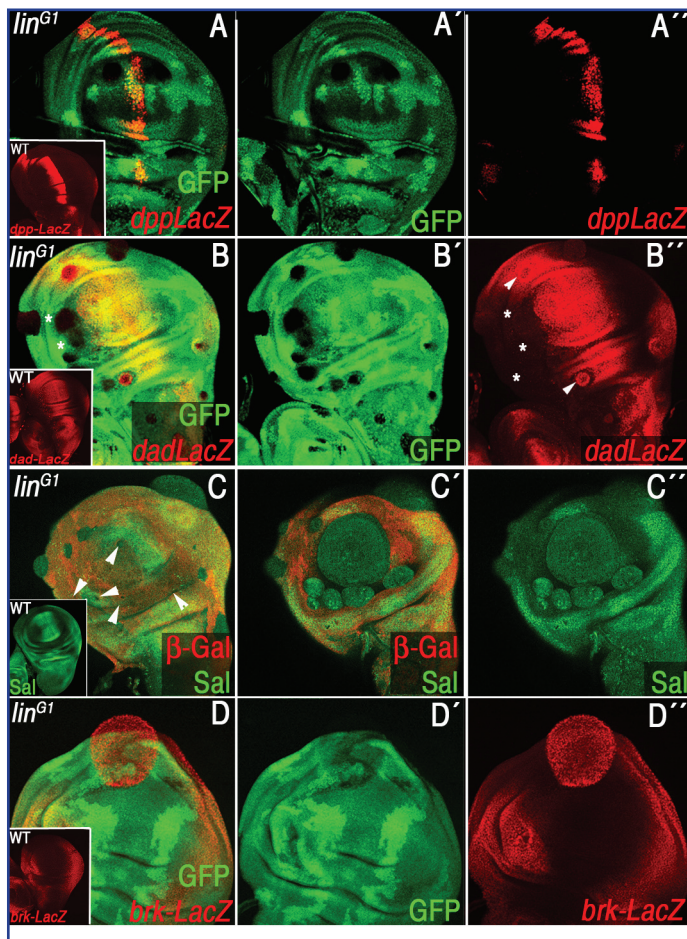
**Figura R.11. Activación de la vía EGF-R en clones *linG1*.**

**A-A'')** Clones *linG1*, marcados por la ausencia de  $\beta$ -Gal (rojo) (A'), expresan ectópicamente C-Iro (verde) (A''). En el recuadro en (A), tinción de Iro en el disco imaginal de ala silvestre. **B-B'')** Clones *linG1* marcados por la ausencia de GFP (verde) (B'), expresan ectópicamente *kek-LacZ* (rojo) (B''). En el recuadro en (B), tinción endógena de *kek-LacZ* en el disco imaginal de ala silvestre. **C)** Expresión endógena de Hth (rojo) y En (azul) en el disco imagina de ala silvestre. **D, D')** Clones *linG1* generados en disco imaginal de ala que además tiene la expresión dirigida de Raf DN en el dominio de expresión de En (Azul), empleando las líneas *en-Gal4* y *UASRaf<sup>DN</sup>*. Clones *linG1* marcados por la ausencia de GFP (verde) (D), activan ectópicamente la expresión de Hth (rojo) (D'), en cualquier posición dentro del disco de ala, independientemente de la expresión de Raf DN. En todos los ejemplos los clones fueron inducidos entre 48-72 h DEH.

### Análisis de la expresión de genes de respuesta a Dpp

Dpp es necesario tanto para la proliferación celular como para la organización del patrón a lo largo del eje A/P en todo el disco imaginal de ala. La señal de Dpp activa la expresión *sal* y *omb*, que codifican dos factores de transcripción necesarios para la formación del ala, y también activa la expresión de *dad*, que codifica una proteína Smad represora. Asimismo, Dpp reprime la expresión del gen *brk*, un represor de la vía que consecuentemente se expresa sólo en los dominios más laterales del disco.

Para saber si *lines* regula la vía de señalización de Dpp, analizamos la expresión de *dpp*, *sal*, *dad*, *omb* y *brk* en clones *lin<sup>G1</sup>*. La falta de función de *lines* no produce ningún cambio en los patrones de expresión de *dpp* y *dad*. Sin embargo, tanto la expresión de *brk*, como la de *sal* se ven alteradas en clones *lin<sup>G1</sup>* inducidos entre 48-72 horas DEH dentro del territorio del ala. Mientras que la expresión de *sal* se reduce, *brk* se activa ectópicamente en clones situados dentro del dominio central del territorio de ala (Figura R.12). Estos resultados sugieren que *lines* regula la expresión de algunos de los genes diana de la vía de Dpp.



**Figura R.12. Análisis de la respuesta a la vía Dpp en clones *lin<sup>G1</sup>*.**

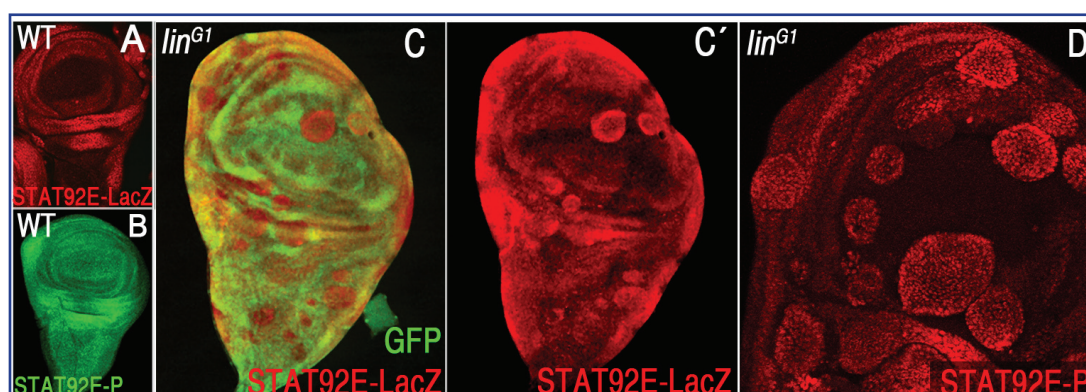
**A-D'')** Clones *lin<sup>G1</sup>* inducidos entre 48-72h DEH en el disco imaginal de ala. **A-A'')** Clones *lin<sup>G1</sup>* marcados por la ausencia de GFP (verde), no afectan a la expresión de Dpp (rojo). En el recuadro en (A) detalle de la expresión de Dpp en un disco silvestre. **B-B'')** Clones *lin<sup>G1</sup>* marcados por la ausencia de GFP (verde), no afectan a la expresión de *dad-LacZ* (rojo). En el recuadro en (B) expresión endógena de *dad-LacZ* en el disco imaginal de ala silvestre. **C-C'')** Clones *lin<sup>G1</sup>* marcados por la ausencia de tinción  $\beta$ -Gal (rojo). Dos planos focales distintos del mismo disco (C, C'). En C las flechas marcan la posición del origen de los clones en el epitelio y en C' las células mutantes reprimen la expresión de Sal (verde) en el dominio central, donde Sal depende de Dpp. En el recuadro de C, se muestra la expresión de Sal en el disco imaginal de ala silvestre. **D-D'')** Clones *lin<sup>G1</sup>* marcados por la ausencia de GFP (verde), activan ectópicamente la expresión de Brk (rojo). En el recuadro en (D), expresión endógena de *brk-lacZ* en el disco imaginal de ala.



### 1.2.2.3.- Regulación de la proliferación celular y la apoptosis por lines.

#### *Análisis de las vías JAK/STAT y Ras/MAPK en clones lines.*

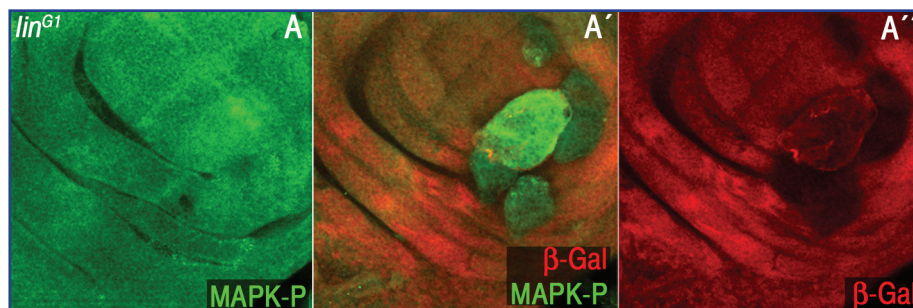
Además de Dpp, existen otras vías de señalización que regulan la proliferación celular durante el desarrollo imaginal entre las que se encuentra la vía de JAK/STAT (Mukherjee et al., 2005; Zeidler et al., 2000). Dado el grado de sobrecrecimiento e hiperplasia observado en los clones *lin<sup>G1</sup>*, quisimos examinar la actividad de la vía JAK/STAT. Para ello se analizó la expresión tanto del gen reportero *STAT92E-lacZ*, y los niveles de expresión de la forma activada de la proteína STAT92E. En ambos casos, se observa la activación ectópica de STAT92E en las células *lin<sup>G1</sup>* cuando los clones son inducidos entre 48-72 horas DEH (Figura R.13).



**Figura R.13.** Activación ectópica de la vía JAK/STAT en clones *linG1*.

**A y B)** Expresión de *STAT92E-LacZ* y de la proteína en su forma activa (STAT92E-P) en el disco silvestre de ala, respectivamente. **C-D)** Clones *linG1* marcados por la ausencia de GFP (verde) (C) activan ectópicamente la expresión de STAT92E, marcado por la tinción de LacZ (rojo) en (C'), y de STAT92E-P en (D).

Otra vía de señalización importante en el control de la proliferación celular es la vía del EGFR a través de la señal Ras/MAPK (Moghal and Sternberg, 1999). Como hemos indicado en el apartado anterior, la vía del EGF-R está activa en los clones *lin<sup>G1</sup>*, confirmado por la expresión ectópica de los genes *Kekkon* y *C-Iro*. Analizamos la expresión de la forma fosforilada de la proteína MAPK (MAPK-P) para evaluar los niveles de actividad de la vía Ras/MAPK. En células *lin<sup>G1</sup>*, la proteína MAPK-P se expresa ectópicamente, sugiriendo que la actividad de la vía Ras/MAPK podría contribuir a la sobreproliferación de las células *lin<sup>G1</sup>* (Figura R.14).



**Figura R.14. Activación ectópica de la vía Ras/MAPK en clones *linG1*.**

**A-A'')** Dos planos focales del mismo disco imaginal. Tinción endógena de MAPK-P en (A). Clones *linG1* marcados por la ausencia de tinción β-Gal (rojo) (A'') expresan ectópicamente MAPK-P (A').

Estos resultados indican que *lines* regula negativamente las vías JAK/STAT y EGF-R. En cualquier caso ambas vías de señalización podrían estar contribuyendo en la sobreproliferación observada en las células mutantes *lines*.

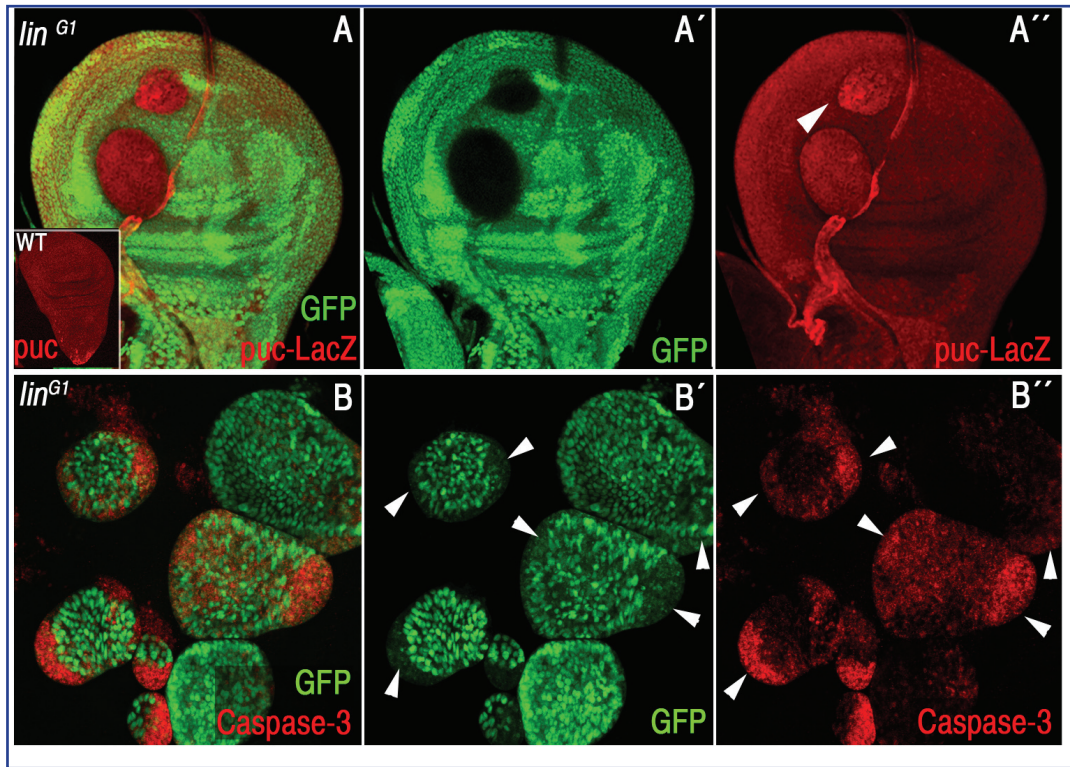
#### ***Análisis de la viabilidad celular de los clones lines.***

La muerte celular programada o apoptosis participa en diversos procesos biológicos para controlar el número final de células que forman un órgano. Además, la apoptosis es también un mecanismo natural para eliminar aquellas células que han sufrido algún daño en el ADN (Jacobson et al., 1997). Un paso crítico en este proceso es la activación de las Cisteínas Proteasas (Caspasas) que degradan los substratos celulares, causando la muerte celular.

Una de las vías que se activa en el disco imaginal de ala durante la muerte celular por apoptosis es la vía Jun N-terminal kinases (JNK) (Adachi-Yamada, 2002; Moreno et al., 2002). El gen *puckered* (*puc*) es un componente de la vía JNK que codifica para una fosfatasa dual, y a su vez es regulado transcripcionalmente por la activación de la vía JNK (Martin-Blanco et al., 1998). Por lo tanto, el nivel de expresión de *puc* puede ser utilizado como marcador de los niveles de actividad de la vía.

Los resultados descritos previamente muestran que las células *linG1* generadas entre 48-72 horas DEH adquieren una ventaja proliferativa autónoma frente a las células silvestres, causando sobrecrecimientos con forma esférica que se delaminan del epitelio. Sin embargo, el análisis fenotípico en la cutícula del insecto adulto muestra que la mayoría de estas células *linG1* no sobreviven. Debido a este hecho, estudiamos diferentes marcadores apoptóticos como son la proteína Caspasa-3 activada y la expresión de *puc<sup>E69</sup>* (*puc<sup>E6</sup>-LacZ*).

La activación de ambos marcadores en las células *lin<sup>G1</sup>* indica que dichas células, aunque tienen ventaja proliferativa respecto a las células silvestres, están sufriendo un proceso apoptótico, de modo que la mayoría no alcanza el final del desarrollo. Dentro de un clon *lin<sup>G1</sup>*, se observan células en el borde del mismo menos redondeadas, una morfología característica de células que entran en apoptosis, y que son precisamente las que expresan mayores niveles del marcador apoptótico Caspasa-3 (Figura R.15).



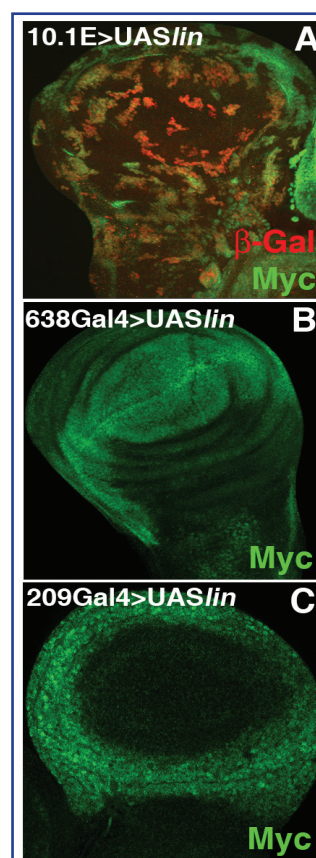
**Figura R.15. Las células mutantes *lines* sufren apoptosis.**

**A-A'')** Expresión de *puc-LacZ* en el disco imaginal de ala con clones *linG1*. Los clones marcados por la ausencia de GFP (verde) (**A'**) expresan *puc-LacZ* (rojo), marcada en la figura (**A''**) por punta de flecha. En (**A**) combinación de los dos canales y expresión endógena de *puc-LacZ* en el disco imaginal de ala. **B-B''**) Expresión de Caspasa-3 activada (rojo) (**B, B''**). Detalle de clones *linG1* en el territorio de ala, inducidos por el sistema MARCM y marcados por la presencia de GFP (verde) (**B**). Las células del borde del clon muestran menor tinción GFP y una morfología menos redondeada que está acompañada por un aumento en los niveles de Caspasa-3 activada, indicando que estas células entran en apoptosis (puntas de flecha).

### 1.3.- Análisis de la ganancia de función del gen *lines*.

Para completar el análisis funcional del gen *lines* en el ala, estudiamos los fenotipos causados por la sobreexpresión del gen tanto en individuos adultos como en el disco imaginal. Para ello analizamos la sobreexpresión de *UAS-lines* en clones individuales (Figura R.16 A) o dirigiendo su expresión en regiones específicas del disco, utilizando diferentes líneas Gal4 que se expresan en la región distal del disco de ala (*Scaloped-Gal4* o *638-Gal4*) (Figura R.16 B) así como también a la región proximal (*Zfh-2-Gal4* o *MS209-Gal4*) (Figura R.16 C). En todos los casos los individuos *UAS-lines*/Gal4 alcanzan la fase adulta, y presentan un ala con una morfología normal. Como es de esperar los clones en el disco imaginal de ala no muestran defectos ni en su forma o tamaño ni afectan a la morfología del disco imaginal.

Estos datos sugieren que el exceso de Lines no interfiere con el desarrollo normal del ala.



**Figura R.16.** Sobreexpresión de Lines en el disco imaginal de ala.

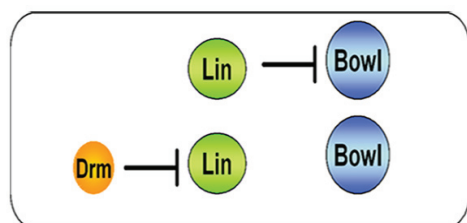
**A)** Clones de sobreexpresión de Lines en el disco imaginal de ala, marcados con  $\beta$ -Gal (rojo). **B)** Expresión de *UAS-lines-Myc* (visualizado en verde) en el territorio de ala, empleando la línea *638-Gal4*. **C)** Expresión dirigida de *UAS-lines-Myc* (verde) en la región del hinc, empleando la línea *209-Gal4*. En B y C no se observan alteraciones morfológicas del disco de ala debido a la expresión ectópica de Lines.



## 2.- ESTUDIO DE LOS GENES QUE MEDIAN LOS EFECTOS DE LINES.

### 2.1.-Estudio de la jerarquía funcional del casete Drm/Lines/Bowl.

Durante el desarrollo embrionario, *lines* interacciona funcionalmente con las proteínas Drm y Bowl, dos factores de transcripción pertenecientes a la familia de Odd-Skipped, generando una respuesta celular final a través de una cascada génica de represión en la cual Bowl es el efector final. En el núcleo, la interacción directa entre Lines y Bowl promueve la degradación de Bowl; mientras que la presencia de Drm provoca la relocalización de Lines al citoplasma permitiendo la acumulación de Bowl en el núcleo (Hatini et al., 2005) (ver esquema figura R.17).



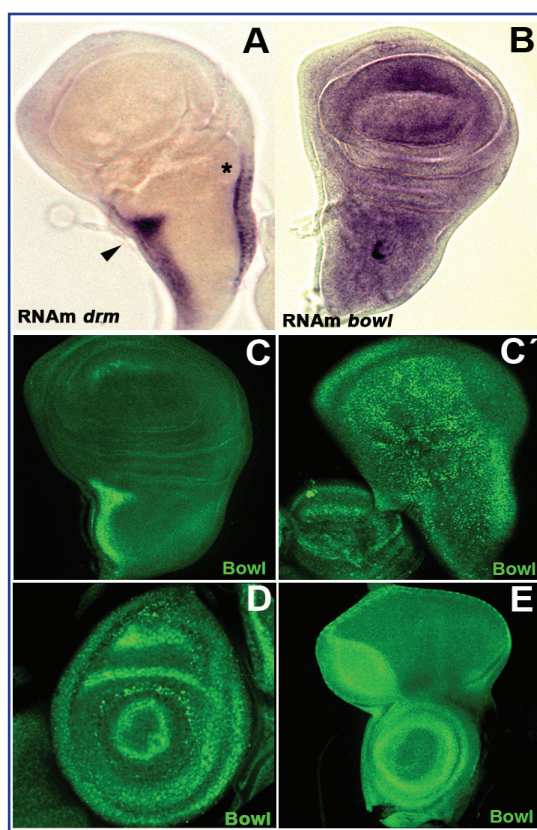
**Figura R.17. Esquema del mecanismo de represión Drm/ Lines/ Bowl.**

En el desarrollo embrionario, Lines impide que Bowl se acumule en el núcleo. La presencia de Drm en el núcleo inhibe la función represora de Lines sobre Bowl.

Nos planteamos estudiar si Lines utiliza la interacción con estas proteínas para ejercer su función en el disco imaginal de ala. Es decir, si el mecanismo de acción se conserva y por tanto las diferentes funciones de Lines ocurren a través de la represión de Bowl.

Para ello, primero examinamos la expresión de *drm* y *bowl* en el disco imaginal de ala. Mediante hibridación *in situ*, observamos que el ARNm de *drm* se expresa en una estrecha banda de células a lo largo del borde anterior del notum, en las células cuboidales y en las células de la membrana peripodial (Figura R.18A).

Estos dominios de expresión coinciden con los sitios donde la localización de Lines es citoplasmática. Por el contrario, la expresión del ARNm de *bowl* es generalizada en todo el disco imaginal de ala (Figura R.18B). Sin embargo, la proteína Bowl se expresa sólo en las áreas donde se expresa el ARNm de *drm*. En este dominio, Bowl se acumula nuclearmente (Figura R.18C). Es interesante destacar que en todos los discos imaginales, las células que expresan Bowl coinciden con aquellas donde la localización de Lines es citoplasmática (Figura R.18E y D). Esta observación está de acuerdo con el modelo en el que Lines impide la acumulación nuclear de Bowl excepto en aquellas células en las que Drm está presente.



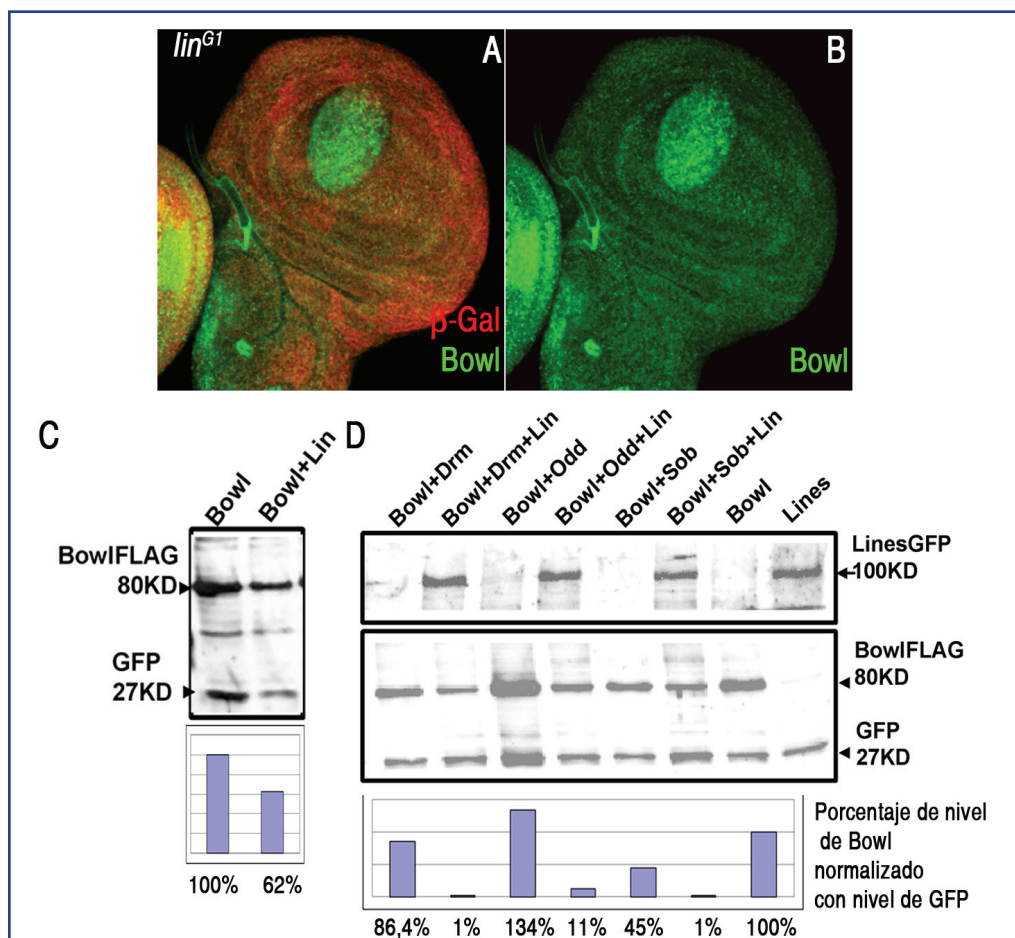
**Figura R.18. Expresión de Drm y Bowl en el disco imaginal de ala.**

**A)** Expresión de ARNm de *drm* en una estrecha banda de células en el borde más anterior del notum (flecha) y en la parte posterior, que corresponde con las células cuboidales que van a dar lugar a la pleura (asterisco). **B)** La expresión de ARNm de *bowl* es ubicua en el disco imaginal de ala. **C, C')** Expresión de la proteína Bowl en el disco imaginal de ala. Bowl se expresa en las células epiteliales en una estrecha banda del borde más anterior del notum (C) y en las células de la membrana peripodial (C'). **D)** En el disco imaginal de pata. Bowl se expresa en anillos concéntricos, que coinciden con las regiones que darán lugar a las articulaciones en la pata adulta. **E)** Expresión de Bowl en el disco imaginal de ojo-antena. En la región presuntiva de antena Bowl se expresa en anillos concéntricos, que corresponden con las zonas de unión entre los segmentos antenales. En la región presuntiva de ojo, Bowl se expresa sólo en las células de la membrana peripodial.

### 2.1.1.- *lines* impide la acumulación nuclear de Bowl.

Para estudiar si la falta de *lines* permite la estabilización de Bowl en el disco imaginal de ala, analizamos la expresión de Bowl en clones *lin<sup>G1</sup>* generados entre 48-72 horas DEH. En todos los casos, las células *lin<sup>G1</sup>* expresan altos niveles de proteína Bowl independientemente de la posición del clon dentro del disco de ala (Figura R.19A).

Para analizar más en detalle el efecto de *Lines* sobre la estabilidad de Bowl, realizamos ensayos de co-transfección en cultivos celulares utilizando células S2. En las transfecciones usamos las construcciones *UAS-linesGFP* y *UAS-bowlFlag*, que contienen la región codificante completa de ambos genes bajo el promotor UAS, inducible por la proteína Gal4. Para poder identificar fácilmente las proteínas, estas llevan unido un epítipo GFP y Flag. Analizamos, mediante Western Blot, los niveles de proteína Bowl en los extractos obtenidos a partir de las células transfectadas. En los extractos de las células transfectadas con *Lines+Bowl*, se aprecia un descenso en los niveles de proteína Bowl, respecto a los obtenidos de los extractos de células que sólo fueron transfectadas con Bowl. Los ensayos de transfección en ambos casos se realizaron además en presencia de una construcción *UAS-GFP*, para normalizar los niveles de proteínas (ver materiales y métodos) (Figura R.19B).



**Figura R.19. Lines influye en la estabilidad de Bowl.**

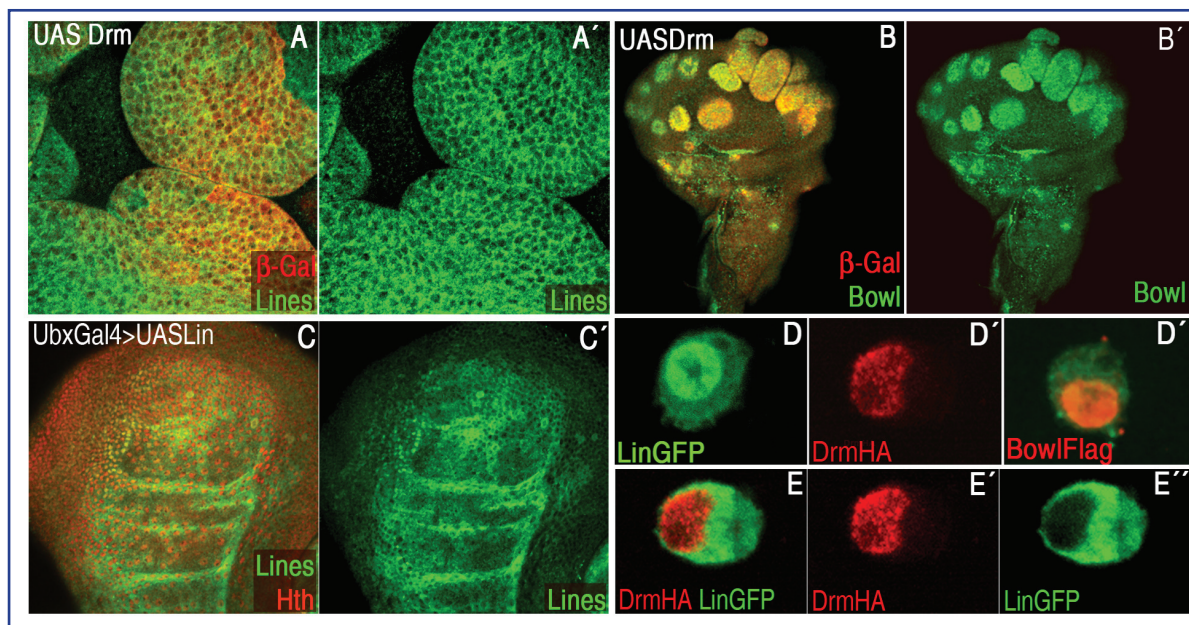
**A, B)** Clon *linG1* marcado por ausencia de  $\beta$ -gal (rojo) expresa ectópicamente la proteína Bowl (verde) (**A**). **C)** Análisis mediante Western Blot de la estabilidad de Bowl a partir de extractos celulares de células S2 transfectadas con Bowl en ausencia y en presencia de Lines. La presencia de Lines reduce los niveles de Bowl a un 62%. **D)** El análisis de la estabilidad de Bowl a partir de extractos celulares de células S2 transfectadas con Bowl con cada uno de los miembros de la familia Odd-Skipped en ausencia y en presencia de Lines muestran que Drm, Odd y Sob estabilizan Bowl en ausencia de Lines. Todas las tranfecciones fueron realizadas en presencia de GFP para normalizar los niveles de proteína. Las gráficas muestran los porcentajes entre los niveles de proteína Bowl /GFP medidos en unidades de densidad óptica (D.O).

De los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*, se concluye que la ausencia de Lines permite la estabilización de Bowl, mientras que su presencia lleva a la pérdida de la proteína.

### 2.1.2.- La sobreexpresión de Drumstick mimetiza la falta de *lines*.

#### *La sobreexpresión de Drumstick estabiliza a Bowl*

El siguiente paso fue analizar, en el disco imaginal de ala, si la presencia de Drm era capaz de impedir la función de Lines y por tanto favorecer la estabilización de la proteína Bowl. Para ello generamos clones de expresión ectópica de Drm entre 48-72 horas DEH y estudiamos la localización subcelular de Lines utilizando un anticuerpo específico. La expresión de Drm provoca la relocalización de Lines al citoplasma (Figura R.20A) y por tanto facilita la estabilización de Bowl (Figura R.20B).



**Figura R.20. Drm impide la función de Lines a través de su relocalización al citoplasma.**

**A-B´)** Clones de expresión ectópica de Drm. **A)** Detalle de la sobreexpresión de Drm marcada por presencia de tinción  $\beta$ -Gal (rojo) relocaliza Lines (verde) en el citoplasma (**A´**). **B, B´)** Clones de GDF de Drm marcada por presencia de tinción  $\beta$ -Gal (rojo) (**B**) acumulan proteína Bowl (verde), independientemente de la posición del clon en el disco imaginal de ala (**B´**). **C, C´)** Sobreexpresión de *UAS-lines* mediante la línea *Ubx-Gal4* a las células de la membrana peripodial del disco imaginal de ala. La localización de Lines es citoplasmática (verde) en la membrana peripodial. Los núcleos se marcaron con la expresión de Hth (rojo). Ambas expresiones son complementarias. **D-E´´)** Células S2 transfectadas. *UAS-linesGFP* (verde) (**D**), *UAS-drmHA* (rojo) (**D´**) y *UAS-bowlFLAG* (rojo) (**D´´**) se localizan en el núcleo cuando se transfectan independientemente. La cotransfección de Lines junto con Drm (rojo) (**E**) promueve la salida de Lines (verde) al citoplasma de la célula (**E´´**).

Empleamos la construcción *Ubx-Gal4*, para dirigir la expresión de Lines en las células de la membrana peripodial donde se expresa Drm. Observamos que, a pesar de forzar los niveles de proteína Lines, la coexpresión de ambas proteínas hace que la localización de Lines sea citoplasmática en las células de la membrana peripodial (Figura R.20C).

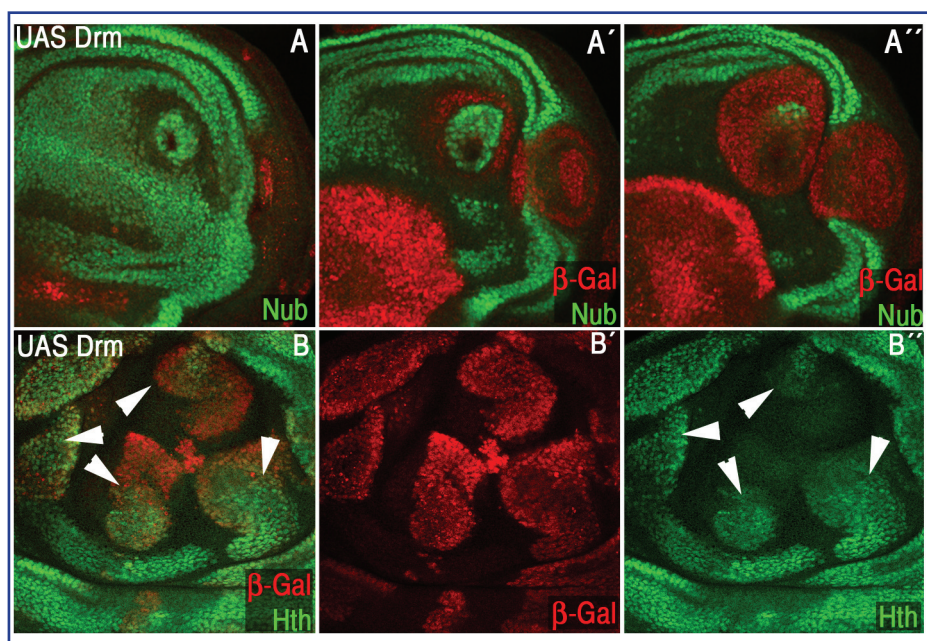
Por tanto, en el disco imaginal de ala, al igual que sucede en el embrión, Drm promueve la relocalización de Lines desde el núcleo al citoplasma, inhibiendo así su función y permitiendo la estabilización de Bowl.



La capacidad de Drm para relocalizar Lines al citoplasma también se analizó mediante la co-transfección de S2 con las construcciones *UAS-linesGFP* y *UAS-drmHA*. Mediante tinción inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos contra los epítomos GFP y HA, se observó que la presencia de Drm impide la localización nuclear de Lines, que se encuentra en el citoplasma cuando ambas proteínas son co-expresadas (Figura R.20D-E).

***La sobreexpresión de Drumstick genera cambios de identidad en el eje P/D.***

Dado que Drm es capaz de permitir la estabilización nuclear de Bowl, bloqueando la función de Lines, quisimos estudiar si la expresión ectópica de Drm era capaz de reproducir los cambios en la regulación de los genes que se expresan en el eje P/D típicos de la falta de función de *lines*. Para detectar los cambios de identidad celular, generamos clones de expresión ectópica de Drm entre 48-72 horas DEH y analizamos la expresión de Nub y Hth, marcadores de los territorios de ala distal y proximal, respectivamente. Los clones de sobreexpresión de Drm en la región del ala activan el marcador proximal Hth (Figura R.21B) y esta expresión de Hth va acompañada de la pérdida del marcador distal Nub (Figura R.21A).

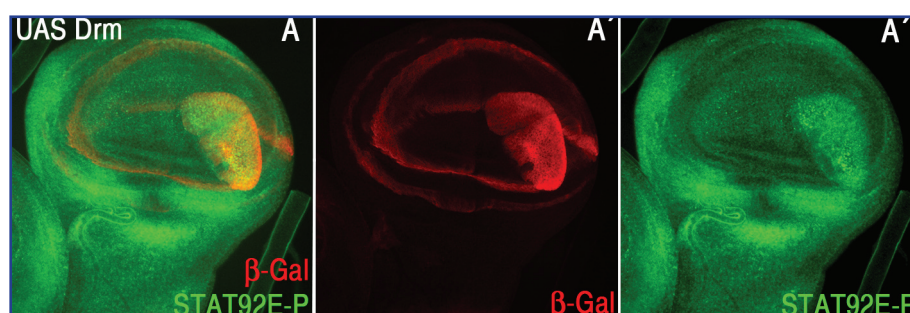


**Figura R.21. La sobreexpresión de Drm produce cambios de identidad en el eje P/D similares a la falta de lines.**

**A-B'')** Clones de expresión ectópica de Drm en el disco imaginal de ala. **A-A'')** Tres planos focales de un mismo disco imaginal mostrando la expresión endógena de Nub (verde) (A) y la falta de expresión de Nub en las células mutantes marcadas con tinción  $\beta$ -Gal (rojo) (A' y A''). **B-B'')** Clones de sobreexpresión de Drm marcados por la tinción de  $\beta$ -Gal (rojo) (B'), expresan ectópicamente Hth (verde) (B'').

### ***La sobreexpresión de Drumstick incrementa la proliferación celular.***

Las células que expresan Drm ectópicamente presentan una elevada proliferación con respecto a las células silvestres del disco de ala, y en ocasiones el tamaño de los clones Drm es mayor que el observado en clones de falta de función *lines*. Del mismo modo que en los clones *lin<sup>G1</sup>* (ver el 1er apartado), examinamos la actividad de la vía JAK/STAT en clones de sobreexpresión de Drm inducidos entre 48-72 horas DEH. Observamos que las células que expresan Drm producen la acumulación de la proteína STAT92E lo que indica que la vía JAK/STAT está activada en estos clones y por tanto podría explicar la elevada proliferación (Figura R.22).



**Figura R22. La sobreexpresión de Drm incrementa la proliferación celular y activa la vía de JAK/STAT.**

A-A'') Clones de expresión ectópica de Drm en el disco imaginal de ala. Expresión ectópica de la forma activa de la proteína STAT92E-P (verde) (A'') en células que expresan Drm, marcadas por tinción con β-Gal (rojo) (A').

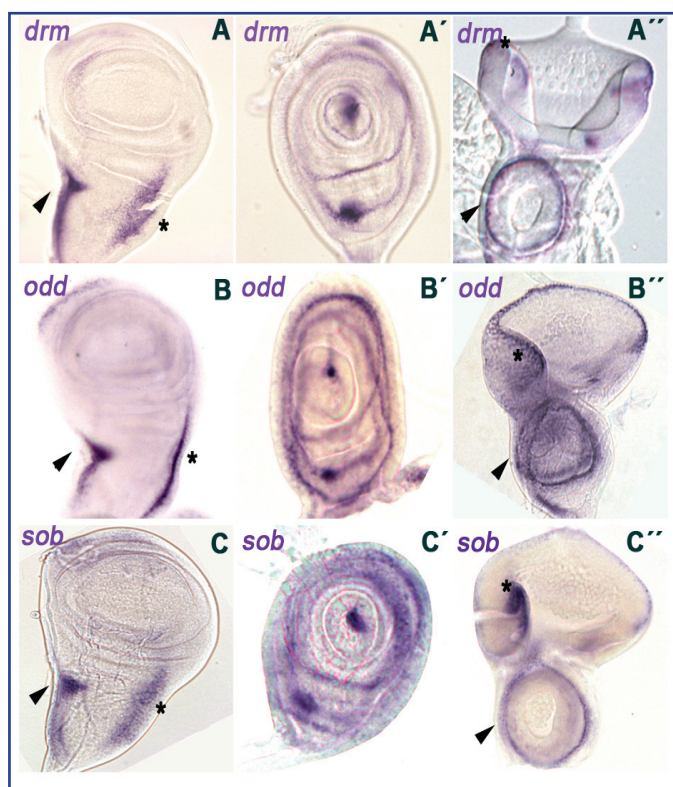
Los resultados descritos en los apartados anteriores demuestran que la sobreexpresión de Drm inhibe la función de la proteína Lines, mediante su relocalización al citoplasma, y por eso la expresión ectópica de Drm mimetiza a nivel fenotípico la falta de *lines*. A partir de ahora, emplearemos indistintamente la ganancia de función (GDF) de Drm o la pérdida de función (PDF) de *lines* para analizar los requerimientos de *lines* durante el desarrollo del disco imaginal de ala y nombraremos Lines<sup>-</sup> para referirnos a la falta de la proteína, bien por su ausencia en células *lin<sup>G1</sup>* o por su desplazamiento del núcleo en células que sobreexpresan Drm.

### **2.2.- Función de las proteínas Odd-Skipped durante el desarrollo imaginal.**

En diversos contextos del desarrollo de *Drosophila*, se ha descrito que además de *drm*, otros dos miembros de la familia génica *odd-skipped*: *odd* y *sob*, también pueden regular la función de Bowl (Johansen et al., 2003; Saulier-Le Drean et al., 1998; Tena et al., 2007). El alto grado de conservación a nivel de secuencia que existe entre los miembros de la familia *odd-skipped*, y el hecho de que estos genes tengan patrones de expresión similares durante el desarrollo embrionario, sugiere que sus funciones pueden ser redundantes (Hart et al., 1996).

Analizamos en los discos imaginales los patrones de expresión de *odd* y *sob*, mediante hibridación *in situ* empleando sondas de ARNm específicas para cada uno de ellos. Los genes *drm*, *odd* y *sob* tienen un patrón de expresión idéntico (Figura R.23).

En el disco imaginal de ala, *odd* y *sob* se expresan en una estrecha banda de las células del borde anterior y posterior del notum, que se continúa en las células cuboidales y en la membrana peripodial. En el disco imaginal de pata, los tres genes se expresan en anillos concéntricos, en las regiones que van a dar lugar a las articulaciones de la pata. En el disco imaginal de ojo-antena también se expresan en anillos concéntricos en la región correspondiente a la antena y en la membrana peripodial situada en la región del disco que va a dar lugar al ojo. Como hemos mostrado anteriormente, la distribución del ARNm de *bowl* en el disco imaginal de ala es diferente a la del resto de los miembros de la familia *odd-skipped*. Esta diferencia en sus patrones de expresión también ocurre en el embrión (Hart et al., 1996), y reforzaría la existencia de una diferencia funcional entre *bowl* y el resto de los miembros de la familia.

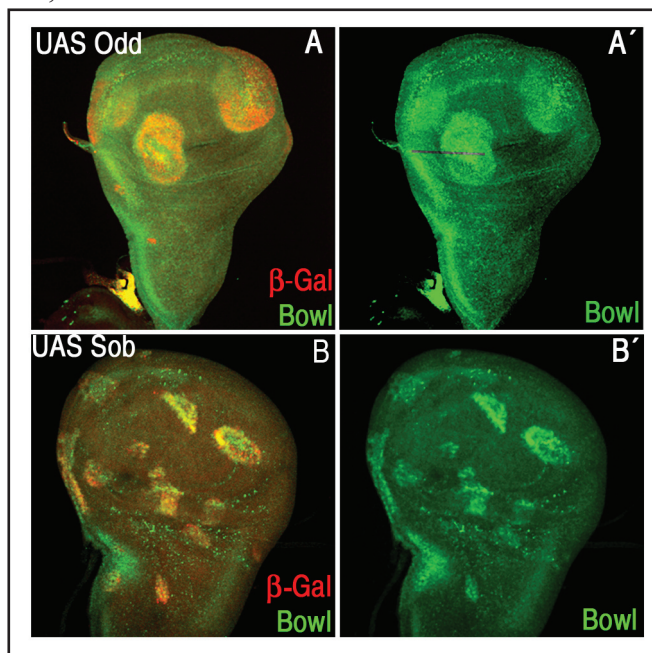


**Figura R.23. Patrón de expresión de la familia de proteínas Odd-Skipped**  
**A-C'')** Expresión de ARNm de *drm*, *odd* y *sob* en los discos imaginales de ala.  
**A, B y C)** Expresión de ARNm de *drm*, *odd* y *sob* en el disco imaginal de ala.  
*drm* (A), *odd* (B) y *sob* (C) se expresan en una estrecha banda de células en el borde más anterior del notum (flechas) y en la parte posterior, que corresponde con las células de la membrana peripodial (asteriscos). **A', B' y C')** Expresión de ARNm de *drm* (A'), *odd* (B') y *sob* (C') en el disco imaginal en anillos concéntricos, que coinciden con los bordes de segmentos. **A'', B'' y C'')** Expresión de ARNm de *drm* (A''), *odd* (B'') y *sob* (C'') en el disco imaginal de ojo-antena en anillos concéntricos en la región presuntiva de antena (flechas), y en la membrana peripodial de la región presuntiva de ojo (asteriscos).



### 2.2.1.- Las proteínas Odd y Sob favorecen la acumulación nuclear de Bowl.

Dada la posibilidad de que estos genes tuvieran funciones redundantes o solapantes por expresarse según el mismo patrón, quisimos estudiar si tanto *odd* como *sob* tienen funciones similares a *drm*. Para ello, Odd y Sob se expresaron de forma ectópica en clones inducidos entre 48-72 horas DEH y se analizó mediante inmunohistoquímica la expresión de Bowl. Los resultados obtenidos muestran que tanto los clones de sobreexpresión de Odd como los de Sob, acumulan altos niveles de Bowl en el núcleo (Figura R.24), indicando que ambos



son capaces de inhibir la función de Lines permitiendo la estabilización de Bowl.

**Figura R.24. La sobreexpresión de Odd y Sob estabiliza Bowl en el disco imaginal de ala.**

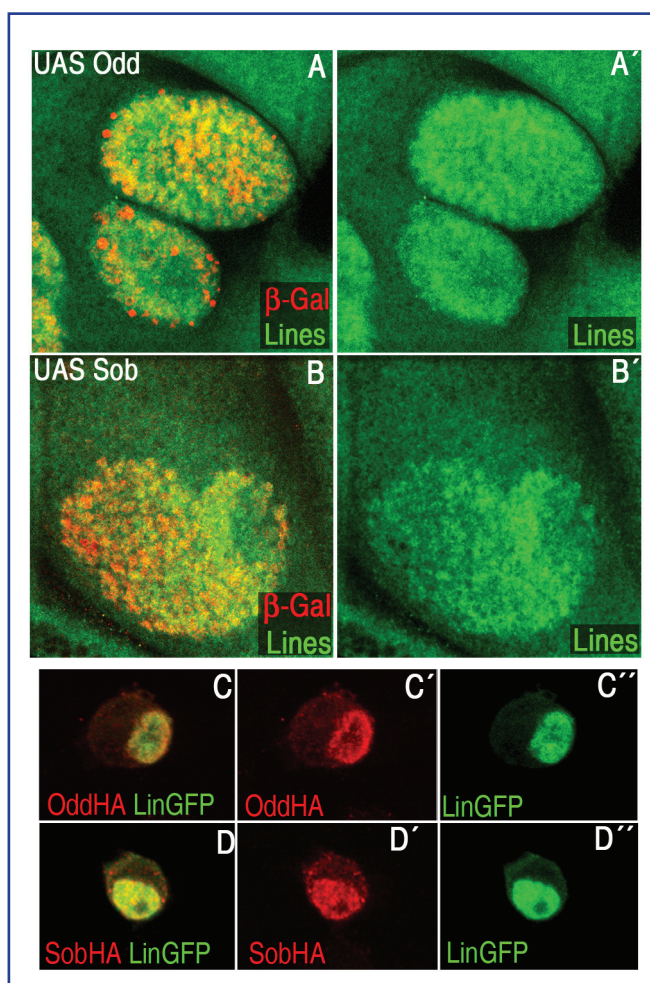
**A-B'**) Clones de expresión ectópica de Odd (A) y Sob (B), en el disco imaginal de ala, marcados por la tinción  $\beta$ -Gal (rojo) estabilizan la proteína Bowl (verde)

### 2.3.- Estudio de la interacción de Lines y los diferentes miembros de la familia Odd-Skipped.

Como Odd y Sob también impiden la degradación de Bowl, nos preguntamos si el mecanismo por el que actúan era el mismo que Drm, es decir, promoviendo la salida de Lines del núcleo. Para testar esta hipótesis, analizamos la localización subcelular de Lines en clones de sobreexpresión de Odd y Sob en el disco imaginal de ala. Sorprendentemente, observamos que ni Odd ni Sob son capaces de promover la salida de Lines del núcleo. Más aún, parece que los niveles nucleares de Lines aumentan (Figura R.25A-B). Por lo tanto, Odd y Sob impiden la degradación de Bowl por Lines, pero actúan de modo diferente a Drm.

Para estudiar si las proteínas Odd y Sob colocalizan con Lines, se hicieron ensayos de co-tranfección en células S2. En las transfecciones usamos las construcciones, *UAS-linesGFP*, ya descrita anteriormente, *UAS-oddHA* y *UAS-sobHA*, con el epítipo HA fusionado para facilitar la identificación de las proteínas Odd y Sob. La tinción de las células transfectadas, con anticuerpos contra GFP y HA mostró que, como observamos en el disco imaginal, ni Odd ni Sob promueven la salida de Lines del núcleo. Así, en presencia de Odd y Sob, Lines permanece localizada en el núcleo junto con Odd y Sob (Figura R.25C-D).





**Figura R.25. Localización subcelular de Lines con las proteínas Odd y Sob.**

A-B') Clones de sobreexpresión de Odd (A) y Sob (B) marcados por tinción de  $\beta$ -Gal (rojo), acumulan proteína Lines (verde) en el núcleo. C-D') Células S2 transfectadas. *UAS-linesGFP* (verde), *UAS-oddHA* y *UAS-sobHA* (rojo). La cotransfección de Lines junto con Odd (C') o Sob (D') no produce la salida de Lines (verde) al citoplasma de la célula (C'' y D'').

### 2.3.1.- Estudios de interacción molecular entre Lines y la familia Odd-Skipped.

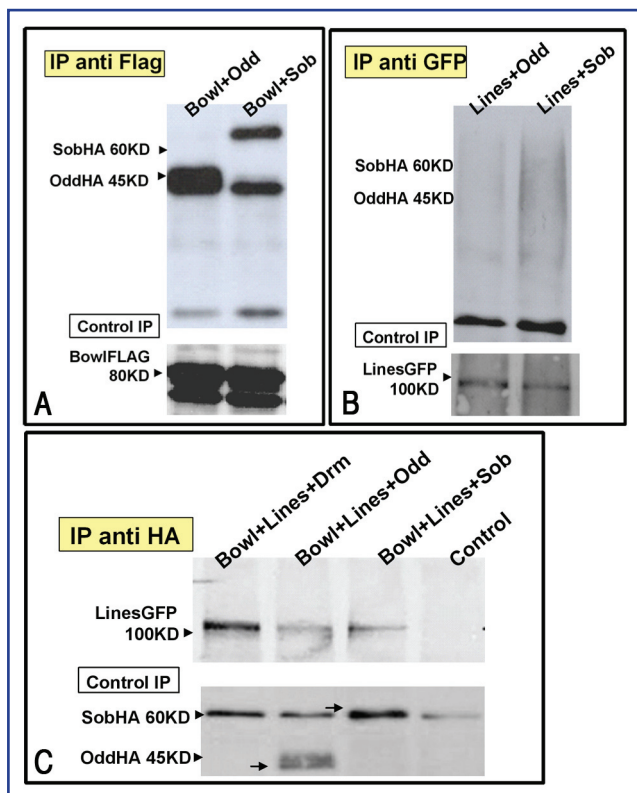
Si Odd y Sob son capaces de coexistir en el núcleo con la proteína Lines, la siguiente pregunta que nos planteamos fue ¿cómo actúan estas proteínas para permitir la estabilización de Bowl en presencia de Lines?

Lines interacciona directamente con las proteínas Drm y Bowl, a través de la unión a los dedos de Zinc tipo  $C_2H_2$  que ambas proteínas tienen en la región Nt (Green et al., 2002; Hatini et al., 2005). Sin embargo, no hay datos acerca de una posible interacción de Lines con Odd y Sob. Para analizar si Lines es capaz de interaccionar directamente con estas proteínas, realizamos experimentos de co-transfección en células S2 y de co-inmunoprecipitación (IP). Para ello co-transfectamos células S2 con las combinaciones *UAS-linesGFP*+*UAS-oddHA* y *UAS-linesGFP*+*UAS-sobHA*, y posteriormente los extractos celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo dirigido contra HA. Los resultados muestran que Lines no interacciona directamente con Odd y Sob (Figura R26A).

Alternativamente, las proteínas Odd y Sob podrían estar interaccionando con Bowl. Para testar esta hipótesis, realizamos ensayos de IP a partir de células transfectadas con las combinaciones *UAS-bowlFlag*+*UAS-oddHA* y *UAS-bowlFlag*+*UAS-sobHA*. En los ensayos

de IP, utilizamos el anticuerpo Flag para precipitar Bowl. Los resultados muestran que Odd y Sob co-inmunoprecipitan con Bowl sugiriendo que pueden formar complejos proteína-proteína (Figura R.26B).

Para completar el estudio de posibles interacciones entre estas proteínas realizamos ensayos donde las células S2 se co-transfectaron con Bowl junto con Drm/Odd/Sob y además Lines. En estos ensayos de IP, utilizamos el anticuerpo HA para precipitar Drm, Odd y Sob. Los resultados muestran que Lines inmunoprecipita junto con las combinaciones Drm/Bowl, Odd/Bowl y Sob/Bowl, indicando que Lines se une a Odd y Sob, pero sólo en presencia de Bowl (Figura R.26C). Estos resultados sugieren que Lines, Odd y Sob pueden coexistir en el núcleo, y también que Odd y Sob podrían estar formando complejos proteicos con Bowl que impedirían la unión de Lines.



**Figura R.26. Estudio de la interacción molecular de lines y la familia odd-skipped.**

A) IP frente a BowlFLAG co-inmunoprecipita OddHA y SobHA. B) IP frente a LineaGFP no co-inmunoprecipita OddHA ni SobHA. C) IP frente a HA (Odd, Sob y Drm) co-inmunoprecipitan LinesGFP sólo en presencia de Bowl.

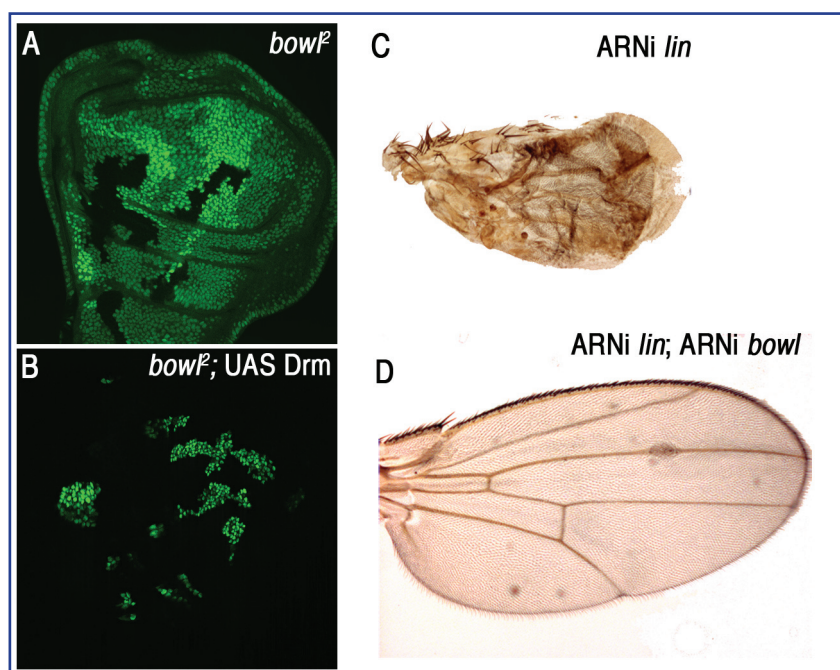
Estos resultados explicarían porqué *in vivo*, la sobreexpresión de Odd y Sob es capaz de estabilizar a Bowl sin que Lines se desplace al citoplasma.

### 2.3.2.- Estudio de las relaciones epistáticas de *lines* y la familia *odd-skipped*.

El modelo de regulación Drm/Lines/Bowl implica que Bowl actúa como efector final de esta vía (Bras-Pereira et al., 2006; Green et al., 2002; Hatini et al., 2005). Quisimos analizar, si en el disco de ala, todos los fenotipos observados en clones *lin<sup>G1</sup>* o de GDF de Drm podían ser debidos a la estabilización de Bowl. Para ello primero, analizamos los fenotipos de falta de función de *bowl*, empleando el alelo nulo *bowl<sup>l2</sup>*. Los clones de falta de *bowl*, generados entre 48-72 horas DEH, no muestran ninguna alteración (Figura R.27A). Del mismo modo, la expresión dirigida del ARN interferente de *bowl* (*UAS-bowlARNi*), utilizando la línea *Sd-Gal4*, que elimina *bowl* completamente en el ala, no produce ningún fenotipo. Ambos resultados eran predecibles, ya que la proteína Bowl no se expresa en el territorio de ala.

Sin embargo, clones de *bowl*<sup>2</sup> en los que se sobreexpresa Drm y que por tanto eliminan funcionalmente Lines y Bowl, no tienen ni bordes redondeados ni sobreproliferación, y tampoco se delaminan del epitelio (Figura R.27B).

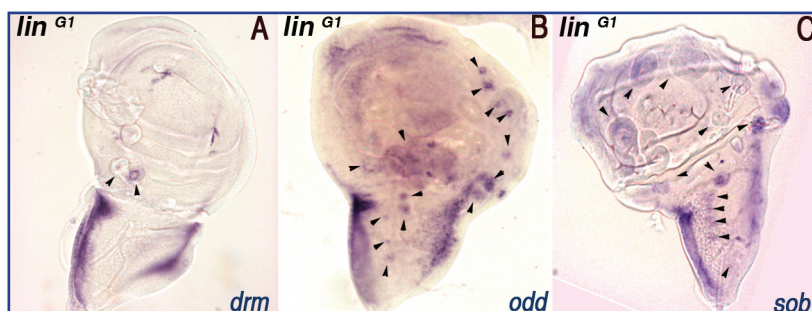
Además, en el ala adulta, los fenotipos causados por la expresión del ARN interferente de *lines* (*UAS-linesARNi*) son totalmente rescatados cuando se co-expresa con *UAS-bowlARNi* (Figura R.27C-D). De estos resultados podemos concluir que Bowl es el efector principal de los efectos observados en las células *lin*<sup>G1</sup> o en los clones de GDF de Drm en el disco de ala.



**Figura R.27. Interacción de regulación Drm/Lin/Bowl en el disco imaginal de ala.**

**A)** Clones de falta de función de *bowl*<sup>2</sup>, marcados por la falta de GFP. **B)** Clones MARCM de falta de función de *bowl*<sup>2</sup> y sobreexpresión de Drm, marcados por la presencia de GFP, no muestran fenotipo de proliferación característico de falta de Lines. **C)** Ala con la expresión de la línea *UAS-lines ARNi /Sd-Gal4*, en el territorio de ala. **D)** La expresión de *UAS-lines ARNi* y *UASbowl ARNi* dirigida a la vez con *Sd-Gal4* revierte el fenotipo causado por la la expresión de *UAS-lines ARNi*.

Dado que la expresión espacial de los genes *drm*, *odd* y *sob* es similar a la de la proteína Bowl en los discos imaginales, quisimos analizar si Bowl regula la expresión de estos genes en el disco imaginal de ala, tal y como se ha visto en el disco de pata (Tesis de J.M.de Celis, 2001). Para testar esta posibilidad se analizó la expresión de ARNm de *drm*, *odd* y *sob* mediante hibridación *in situ* en clones *lin*<sup>G1</sup>. Las células que expresan Bowl, debido a la eliminación de *lines*, activan la expresión de *drm*, *odd* y *sob* (Figura R.28). Este resultado sugiere que Bowl podría estar regulando la transcripción de sus parálogos y ser el mecanismo para mantener Lines en el citoplasma o inactivarlo en las células que expresan Bowl, como es el caso de la membrana peripodial, donde se expresan todos los genes de la familia odd-skipped.



**Figura R.28. Bowl regula la transcripción de *drm*, *odd* y *sob*.**

**A, B y C)** Clones de falta de función de *linG1*, generados entre 48-72 horas DEH, activan ectópicamente *drm* (A), *odd* (B) y *sob* (C) detectados mediante hibridación *in situ* utilizando ribosondas específicas que reconocen los ARNm de cada gen. Los clones se identificaron por los sobrecrecimientos de las células mutantes.

## 2.4.- Divergencia funcional de los genes *odd-skipped*.

Los genes parálogos normalmente presentan un elevado grado de conservación a nivel de secuencia de nucleótidos, ya que suelen derivar de duplicaciones génicas. La existencia de estos genes abre la cuestión del grado de diversidad funcional existente entre ellos. En un principio, las posibles divergencias pueden deberse a cambios en las región codificante, que afecta a las propiedades bioquímicas de cada proteína, y/o a la región reguladora, lo que afectaría a la expresión espacio-temporal de las mismas.

Ya que los patrones de expresión de *drm*, *odd* y *sob* son idénticos en todos los discos imaginales quisimos estudiar la posibilidad de que estos genes tuvieran funciones redundantes. Con este fin, realizamos el análisis funcional de cada uno de ellos en los discos imaginales de ala, pata y ojo-antena mediante la generación de clones de sobreexpresión y analizamos la expresión de diferentes marcadores genéticos.

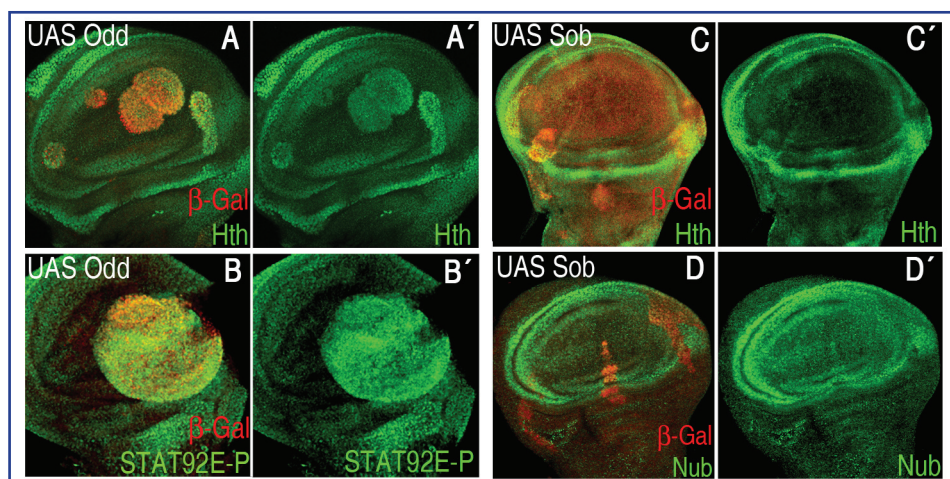
En el apartado 2.3 hemos mostrado, que los clones de sobreexpresión de Odd y Sob inhiben la función de Lines y estabilizan Bowl, de modo diferente a como lo hace Drm, lo que supone ciertas diferencias funcionales para estas dos proteínas.

### 2.4.1.- Efecto de la sobreexpresión de los genes *odd-skipped* en el disco de ala.

Estudiamos la sobreexpresión de Odd y Sob en el disco de ala, para ver si reproducían los fenotipos observados en clones de ganancia de Drm. Los clones de sobreexpresión de Odd en la región del ala producen sobrecrecimientos y en ellos se observa expresión ectópica del marcador proximal Hth (Figura R.29A). Sin embargo, la pérdida del marcador distal Nub es menos evidente que en los clones *linG1* o de GDF de Drm. Por el contrario, la sobreexpresión de Sob no produce ningún cambio en la expresión de Hth y Nub y tampoco se observa la sobreproliferación evidente en los clones Drm y Odd (Figura R.29C-D)



La expresión ectópica de *Drm* produce un incremento en la proliferación con respecto a las células silvestres, y esta proliferación va acompañada de la activación de la vía JAK/STAT. Observamos que la elevada proliferación de las células que expresan *Odd* también va acompañada por la acumulación de STAT92E (Figura R.29B), mientras que en los clones de ganancia de *Sob*, que no sobreproliferan, la proteína STAT92E no se detecta.



**Figura R.29. Sobreexpresión de *Odd* y *Sob* en el disco imaginal de ala.**

**A-B')** Clones de sobreexpresión de *Odd*, marcados por la tinción  $\beta$ -Gal (rojo) activan ectópicamente la expresión de *Hth* (verde en A') y de la forma activada de la proteína STAT92E -P (verde en B'). **C-D')** Clones de sobreexpresión de *Sob*, marcados por la tinción  $\beta$ -Gal (rojo). La expresión del marcador *Hth* (verde en C) no cambia y tampoco lo hace la de *Nub* (verde en D').

Estos resultados indican que el grado de proliferación debido a la sobreexpresión de *Odd* y *Sob* está relacionado con los niveles de actividad de la vía JAK/STAT. Las diferencias entre *Odd* y *Sob* podrían deberse bien a los distintos niveles de expresión de estos transgenes, o, alternatively, indicar una función distinta entre estas proteínas.

#### **2.4.2.- Estudio funcional de los genes *odd-skipped* en el disco de pata.**

Las patas de la mosca derivan de los primordios imaginales de pata localizados en cada uno de los tres segmentos torácicos embrionarios. El desarrollo en estos primordios ventrales está regulado por la actividad conjunta de las rutas de señalización *dpp* y *wg* (Cohen et al., 1989; Lecuit and Cohen, 1997). *Wg* y *Dpp* actúan como morfógenos en la determinación del eje P/D de la pata, de modo que concentraciones altas de ambos activan la expresión del gen *Distal-less* (*Dll*) en la región distal del disco, mientras que bajas concentraciones de ambos morfógenos inducen la expresión de *dachshund* (*dac*) en regiones menos distales. De los nueve segmentos que forman la pata adulta (coxa, trocánter, fémur, tibia y los cinco tarsos) la expresión de *dll* y *dac* definen tres regiones: una región distal que expresa únicamente *Dll* (correspondiente a los cuatro últimos tarsos), otra región central, en la que se coexpresan ambos genes (tarso proximal y tibia distal) y una tercera región más proximal en que sólo

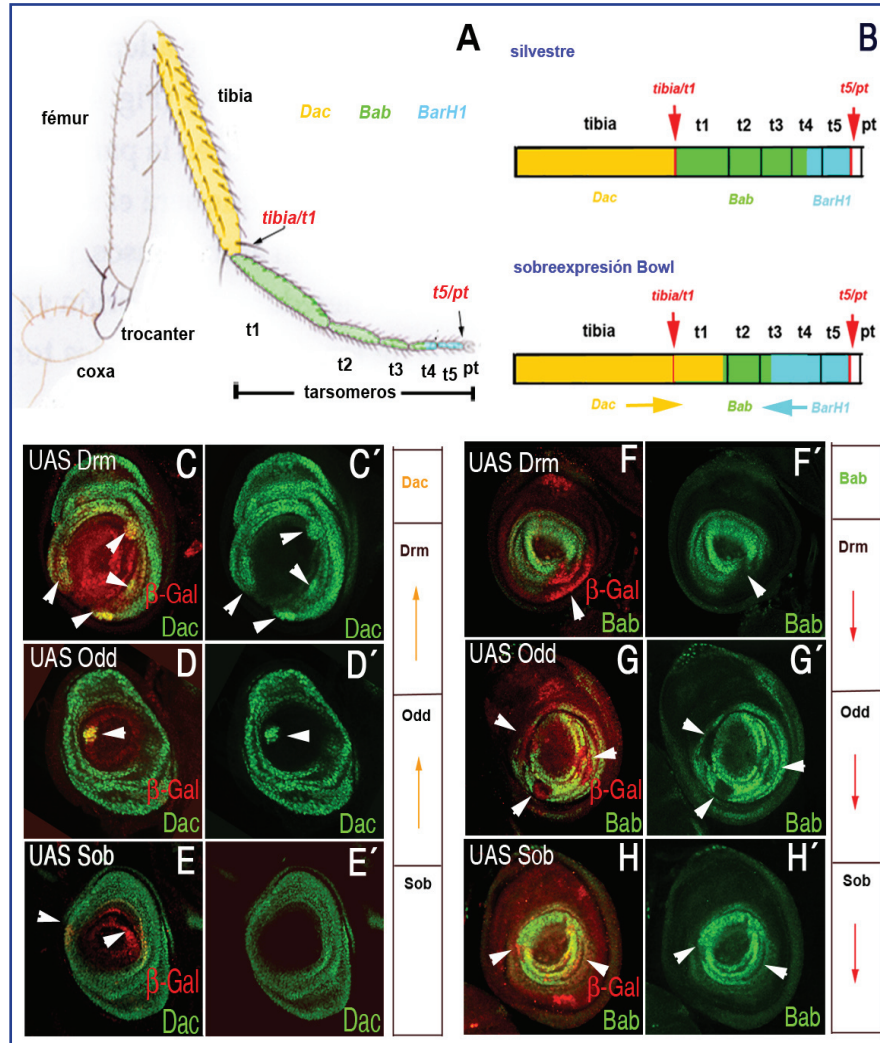
se expresa Dac (tibia proximal y fémur prospectivo). A medida que el disco de pata se va desarrollando, se van intercalando los dominios de expresión de Bric-à-brac- 2 (Bab) (Godt et al., 1993), que se expresa en la región central de los tarsomeros (desde t1 a t4) y de *BarH1* que se expresa en el límite distal (de Celis Ibeas and Bray, 2003) (Figura R.30A).

La naturaleza segmental de la pata, se refleja en el disco imaginal, por la formación de bordes de actividad génica que delimitan los diferentes segmentos y que influyen en la proliferación y formación de su patrón morfogenético (de Celis et al., 1998; Rauskolb and Irvine, 1999). La formación de estos bordes es un proceso que solapa y es dependiente de los dominios de expresión génica y tiene lugar durante el tercer estadio larvario temprano. Los bordes de segmento contribuyen a la formación de unas estructuras especializadas, las articulaciones, que conectan los diferentes segmentos dotando de funcionalidad a la pata (Bishop et al., 1999). La actividad de vía de Notch se requiere para el establecimiento y mantenimiento de estos bordes de segmento, en un proceso que recuerda al establecimiento del borde D/V del disco imaginal de ala. Así, Notch se expresa en anillos concéntricos, y su actividad es necesaria para definir el borde distal de los segmentos a lo largo del eje P/D.

Como ya hemos descrito, Bowl se expresa en el disco imaginal de pata en anillos concéntricos, en los cuales su expresión está regulada por Notch (de Celis Ibeas and Bray, 2003). La expresión ectópica de Bowl reduce el dominio de Bab, y expande los dominios de Dac y BarH1 que se expresan adyacentes a Bab en el límite proximal y distal respectivamente (de Celis Ibeas and Bray, 2003) (Figura R.30B).

Dado que *drm*, *odd* y *sob* presentan un patrón de expresión similar al de Bowl en la pata, estos genes podrían tener funciones redundantes a la de Bowl. Para analizar su función generamos clones de expresión ectópica, en los que se estudió la expresión de diferentes marcadores genéticos. La sobreexpresión de Drm, Odd y Sob, al igual que sucede con clones de ganancia de Bowl, reduce la expresión de Bab (Figura R.30F-H). Sin embargo, cuando analizamos la expresión de Dac, en clones de GDF de Drm y Odd esta aumenta de forma similar a cuando se sobreexpresa Bowl (Figura R.30C-D). Por el contrario, la ganancia de Sob no modifica los niveles de Dac (Figura R.30E).

Estos resultados sugieren que Sob también podría tener una función divergente respecto al resto de los miembros de la familia Odd-Skipped, en el disco imaginal de pata.

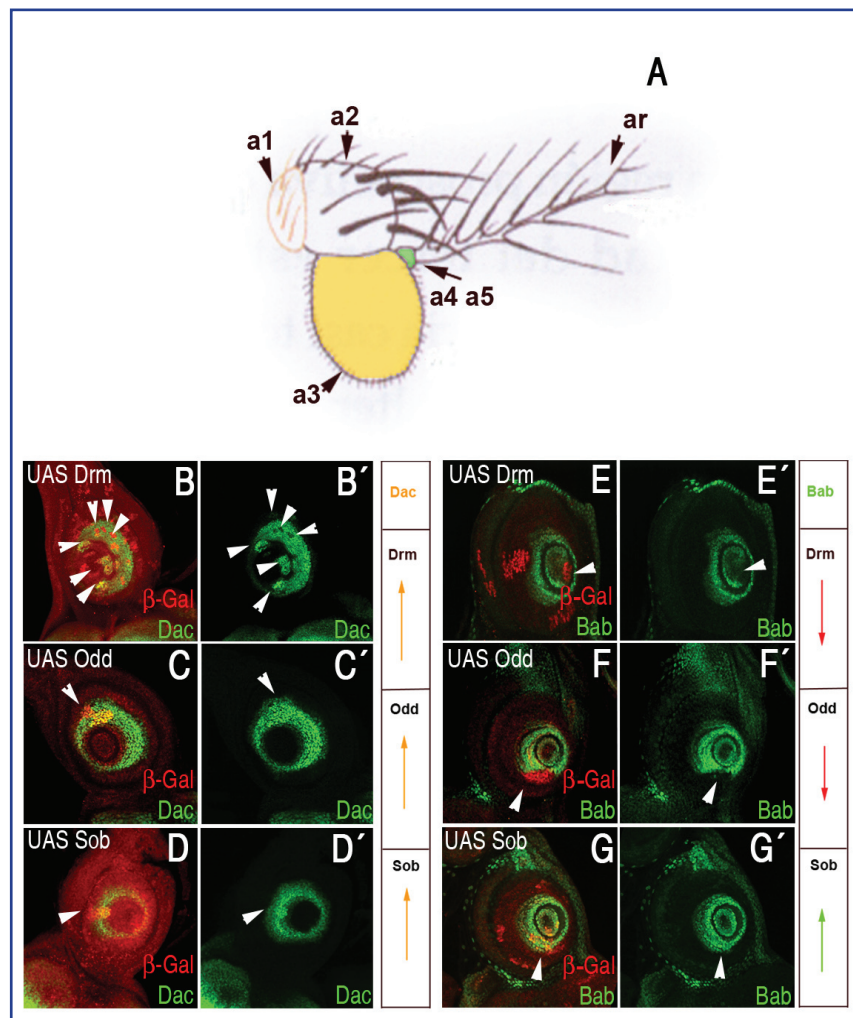


**Figura R.30. Función de los genes odd-skipped en el disco imaginal de pata.**

**A)** Representación de la pata adulta de *Drosophila* y de la expresión de las dianas de Dll: Dac, Bab BarH1. Los segmentos más distales expresan: Dac (amarillo) desde el fémur hasta el primer segmento tarsal (t1), Bab (verde) desde t1 hasta el segmento tarsal 4 (t4) y BarH1 (azul) desde t4 hasta el pretarso (pt). **B)** Esquema de la expresión de genes distales en las patas silvestre y que sobreexpresan Bowl. La expresión de Bowl en el disco imaginal de pata coincide con los territorios que darán lugar a las articulaciones adultas entre tibia/t1 y entre t5/pt (rojo). En los clones de sobreexpresión de Bowl, se extiende el dominio de expresión de Dac (amarillo) y BarH1 (azul) y reduce el dominio de expresión de Bab (verde). **C-E')** Expresión de Dac en disco imaginal de pata. La expresión de Dac (verde) aumenta en clones de sobreexpresión de Drm (C), Odd (D') pero no en los de sobreexpresión de Sob (E'), donde la expresión de Dac no se ve afectada. **F-H')** Expresión de Bab en disco imaginal de pata. La expresión de Bab (verde) se reduce en clones de sobreexpresión de Drm (F'), Odd (G') y Sob (H'). Los clones, marcados por tinción β-gal (rojo), aparecen también en la figura marcados por puntas de flecha bancas.

### 2.4.3.- Estudio funcional de los genes odd-skipped en el disco de ojo-antena.

La antena, que deriva del disco de ojo-antena, es considerada una estructura homóloga a la pata (Morata and Sanchez-Herrero, 1999; Panganiban et al., 1997). Desde un punto de vista morfológico la antena, al igual que la pata adulta, está formada por varios segmentos (cuatro segmentos antenales y la arista). En estadíos tempranos del desarrollo, además de las similitudes morfológicas entre ambas estructuras, existen también similitudes genéticas. Por ejemplo, en la antena la expresión de genes como *dll* y sus genes diana: *dac* y *bab*, tienen dominios de expresión análogos a los de la pata (Cohen et al., 1989; Godt et al., 1993; Mardon et al., 1994) (Figura R.31A).



**Figura R.31. Función de los genes odd-skipped en el disco imaginal de ojo-antena.**

**A)** Representación de los segmentos que componen la antena adulta. *Dac* (amarillo) se expresa en el segmento antenal 3 (a3) y *Bab* (verde) se expresa en dos segmentos subdistales de la arista (a4 y a5). **B-D')** Expresión de *Dac* en disco imaginal de antena. La expresión de *Dac* (verde) aumenta en clones de sobreexpresión de *Drm* (B'), *Odd* (C') y *Sob* (D'). **E-G')** Expresión de *Bab* en disco imaginal de antena. La expresión de *Bab* (verde) se reduce en clones de sobreexpresión de *Drm* (E'), *Odd* (F') sin embargo en clones de sobreexpresión de *Sob* los niveles de *Bab* aumentan ligeramente (G'). Los clones fueron marcados con tinción β-gal (rojo). En los diferentes paneles, las puntas de flecha marcan la posición de los clones.



Siguiendo el mismo planteamiento que en los apartados anteriores, analizamos la función de *drm*, *odd* y *sob* en el disco imaginal de ojo-antena. Se generaron clones de expresión ectópica y se estudió la expresión de Bab y Dac. La sobreexpresión de los tres genes aumenta la expresión de Dac (Figura R.31B-D). Por el contrario, la sobreexpresión de Drm y Odd disminuyen los niveles de expresión de Bab (Figura R.31E-F), mientras que la sobreexpresión de Sob no sólo no disminuye los niveles de Bab, sino que parece aumentarlos (Figura R.31G).

A la vista de los resultados podemos concluir que al igual que sucedía en el desarrollo de la pata, la función de Sob es divergente respecto a la de Drm y Odd.

### 3.- LA FUNCIÓN DE LINES COMO COMPONENTE REGULADOR EN EL MANTENIMIENTO DEL BORDE D/V.

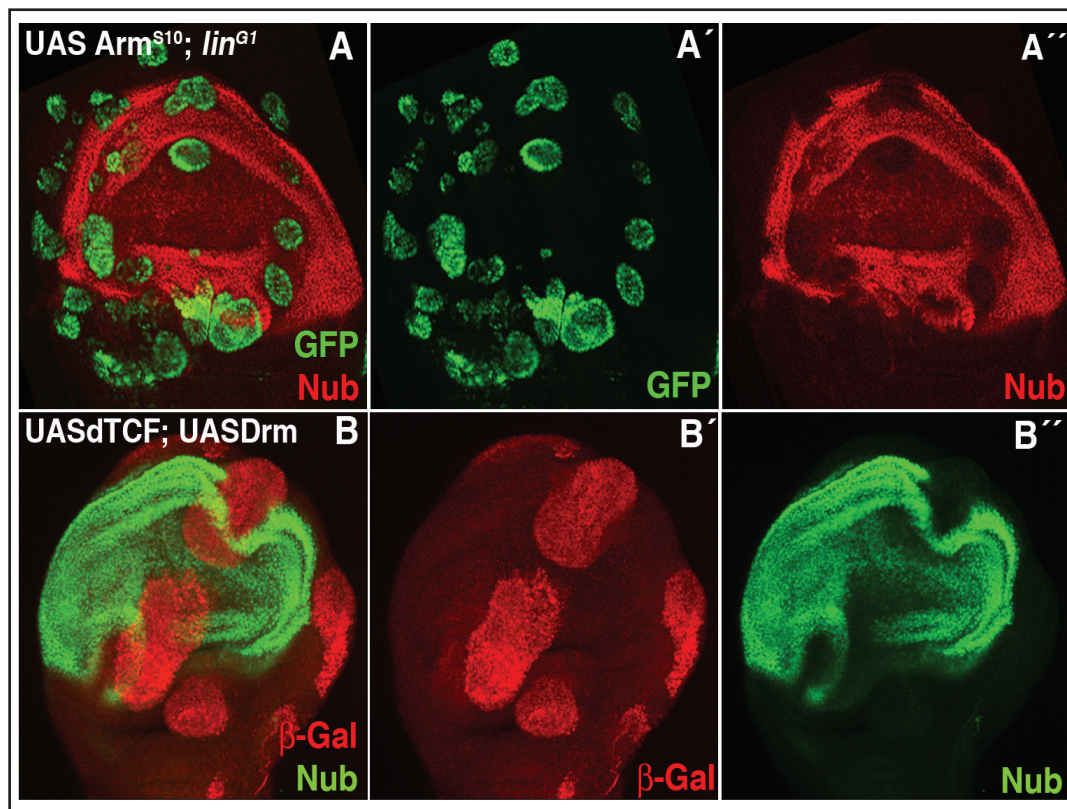
#### 3.1.- Estudio de la función de *lines* en la regulación de las respuestas mediadas por la vía de Wg.

En los apartados anteriores hemos descrito que la falta de *lines* o la sobreexpresión de *Drm*, además de producir un exceso de proliferación, provocan cambios en la identidad P/D. Dado que la subdivisión inicial entre la región distal (ala) y proximal (notum y pleura) en el disco de ala implica la interacción antagónica entre las vías de Wg y EGF-R, estos fenotipos podrían deberse tanto a la represión de la actividad de la vía de Wg como a la activación ectópica de la vía de EGF-R (Baonza et al., 2000; Wang et al., 2000). En el apartado 1 demostramos que la represión de la vía de Wg que muestran las células mutantes *lin<sup>G1</sup>* es independiente de los niveles de actividad de la vía EGF-R, por lo que quisimos estudiar la función de *lines* en la regulación de la actividad de la vía de Wg.

En *Drosophila*, la vía canónica de Wg depende de la estabilización citoplasmática de la proteína Arm, tras la recepción de la señal. Posteriormente, Arm es capaz de entrar en el núcleo e interaccionar con la proteína dTcf, formando un complejo que activa la transcripción de los genes diana (revisado en Tolwinski and Wieschaus, 2004).

Con el objetivo de estudiar a que nivel tiene lugar la represión de la vía de Wg en los clones *lin<sup>G1</sup>*, generamos, mediante el sistema MARCM, clones de falta de *lines* en los que se expresaron tanto una forma constitutivamente activa de Arm (Arm<sup>S10</sup>) (que carece del sitio de fosforilación por GSK-3-β y por tanto escapa a la degradación), como la forma silvestre de dTcf.

Los resultados obtenidos muestran que ni la sobreexpresión de Arm<sup>S10</sup> ni la de dTcf en células *Lines<sup>-</sup>* son capaces de rescatar ni la expresión de marcadores de la identidad P/D, ni el exceso de proliferación de las células mutantes (Figura R.32). Estos datos sugieren que *Lines* actuaría por debajo o en paralelo a Arm, ya que la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de Arm no es capaz de rescatar los fenotipos *lin<sup>G1</sup>*. Una segunda posibilidad es que Bowl reprima la vía de Wg interfiriendo con la función transcripcional de dTcf, ya que es un factor de transcripción con capacidad de unión al ADN.



**Figura R.32. Los fenotipos de *Lines*<sup>-</sup> no se rescatan por la expresión de los activadores transcripcionales de la vía de Wg.**

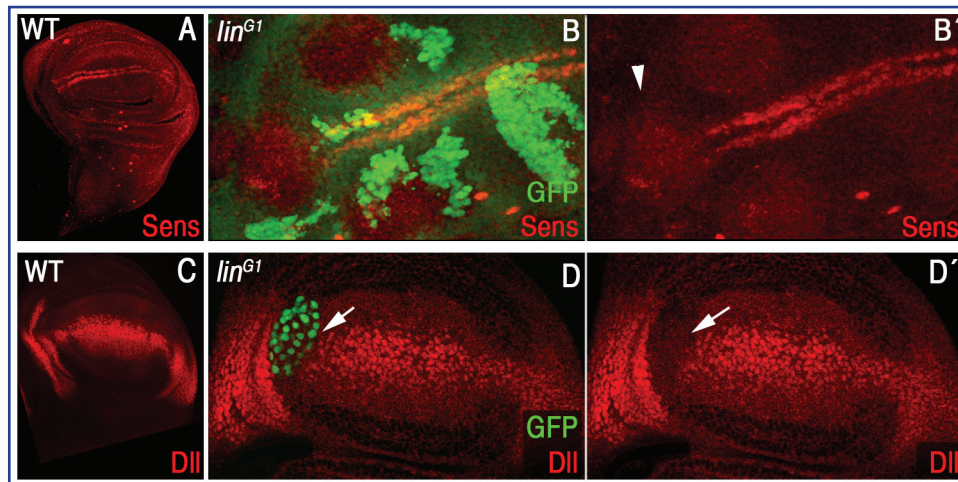
**A-A''**) Clones MARCM de *linG1* junto con la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa ArmS10. En estos clones, marcados por la presencia de GFP (verde) (**A'**) no se expresa Nub (rojo) (**A''**). **B-B''**) Clones que expresan conjuntamente los transgenes UAS-drm y UAS-dTcf, marcados por la expresión de  $\beta$ -Gal (rojo) (**B'**), no expresan Nub (verde) (**B''**). La sobreexpresión de ArmS10 o dTcf no es capaz de reestablecer la pérdida de expresión Nub, en las células *Lines*<sup>-</sup>.

### 3.2.- *Lines* media las respuestas sinérgicas entre las señales de N y Wg durante el mantenimiento del borde D/V del disco de ala.

Al observar que la respuesta temprana a la señal de Wg en el disco de ala está bloqueada en los clones *linG1* inducidos tempranamente (48-72 horas DEH), analizamos si la respuesta a la expresión tardía de Wg en el borde D/V también estaba inhibida en clones *linG1* o GDF de Drm (células *Lines*<sup>-</sup>). Para ello analizamos la expresión de dos dianas de Wg: Senseless (Sens) y Dll que se activan en respuesta a Wg en estadios tardíos del desarrollo del ala, cuando hay una interacción antagónica entre las vías de Notch y la de Wg en el borde D/V, y efectivamente observamos que la expresión de estas dianas se pierde en células *Lines*<sup>-</sup> (Figura R.33).

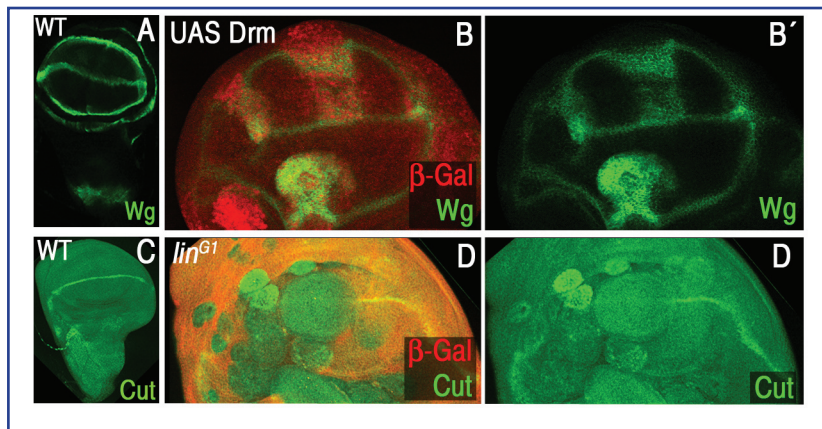
Un mecanismo que podría explicar la falta de respuesta de las células *Lines*<sup>-</sup> a la señal de la vía de Wg es que la vía de Notch estuviera activada ectópicamente en dichas células. En el borde D/V, Notch dirige la expresión de Ct y de Wg (Diaz-Benjumea and Cohen, 1995; Micchelli et al., 1997). En clones *linG1* generados en el borde D/V o inmediatamente adyacente, observamos que tanto Ct como de Wg se activan ectópicamente, lo que sugiere que la vía de

Notch está activada (Figura R.34).



**Figura R.33. La falta de Lines reprime la expresión de dianas de la vía de Wg.**

A) Expresión de Sens en el disco imaginal de ala silvestre. **B-B'** Clones *linG1* marcados por la ausencia de GFP (punta de flecha en B'), pierden la expresión de Sens (rojo) (B'). C) Expresión de Dll en el disco imaginal de ala silvestre. **D-D'** En clones *linG1* marcados por la presencia de GFP (verde) (D), se reprime la expresión de Dll (rojo) (flecha en D y D').



**Figura R.34. En células Lines- se activa la expresión de las dianas de la vía de Notch en el borde D/V.**

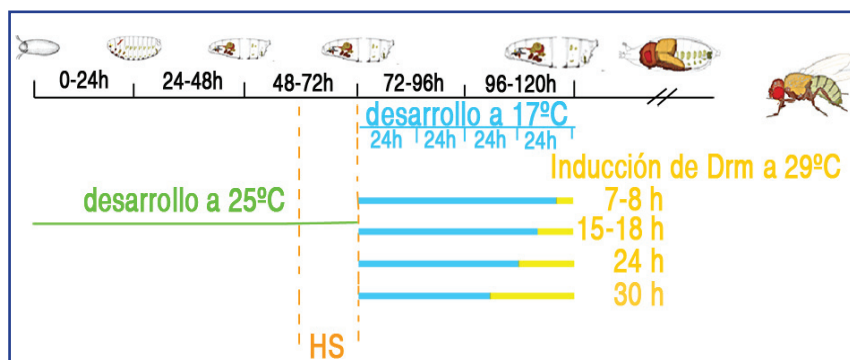
A) Expresión de Wg en el disco imaginal de ala silvestre. **B-B'** Clones de sobreexpresión de Drm, marcados con β-Gal (rojo) (B), activan la expresión de Wg ectópicamente (verde) (B'). C) Expresión de Cut en el disco imaginal de ala sil-

vestre. **D-D'** Clones *linG1* marcados por la ausencia de tinción β-Gal (rojo) (D), activan la expresión de Cut (verde) (D') en aquellos clones cuyo origen está situado dentro del borde D/V.

A pesar de que las células *linG1* son capaces de incrementar la expresión de Wg de forma autónoma, no son capaces de activar la expresión de Sens y Dll. Una posible explicación sería que la actividad de la vía de Notch en los clones *linG1* causara la represión de la vía de Wg, como ocurre en las células en el borde D/V en condiciones silvestres (Diaz-Benjumea and Cohen, 1995; Micchelli et al., 1997). Alternativamente, ambos procesos, la activación de la vía de Notch y la represión de la de Wg, podrían ocurrir de forma independiente.



Para testar ambas hipótesis empleamos el sistema Gal4/Gal80<sup>ts</sup> que nos permite inducir la expresión de Drm, y por tanto la falta de Lines, durante periodos de tiempo controlados (ver esquema Figura R.35). En condiciones restrictivas (29°C) la proteína Gal80 no se expresa, permitiendo la inducción de la proteína Gal4 y por lo tanto la expresión de Drm, vía el transgen *UAS-drm*.

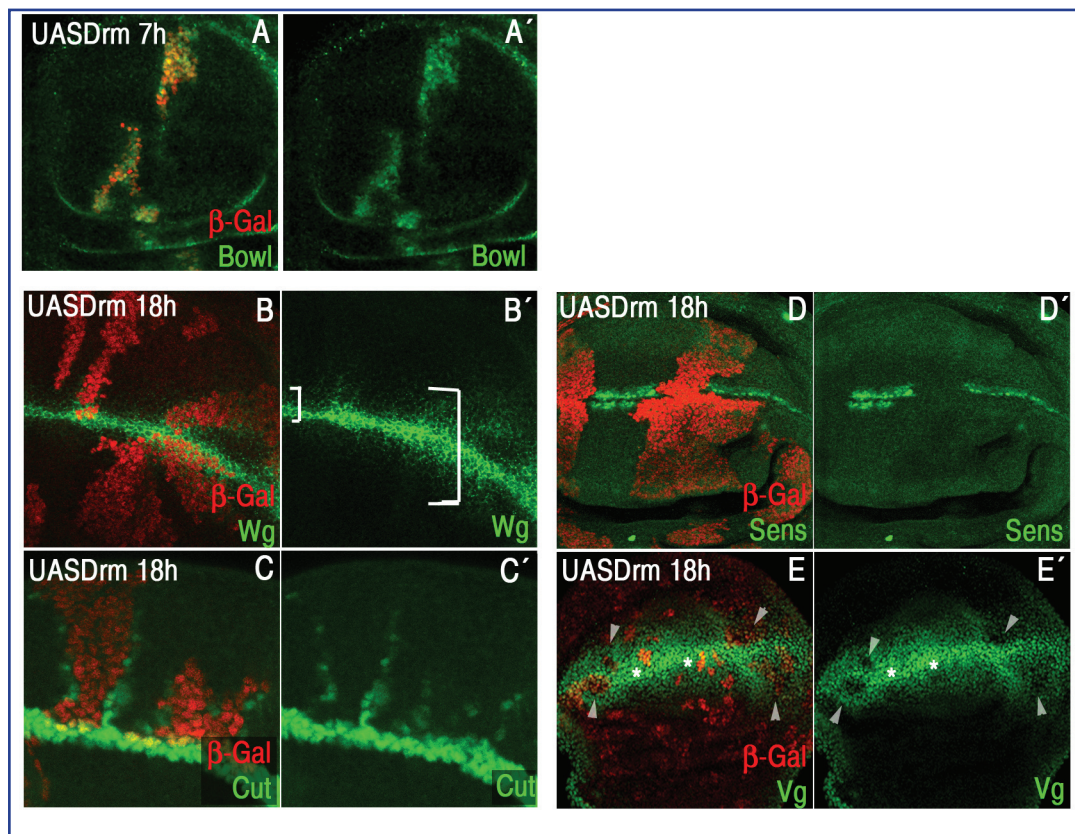


**Figura R.35. Esquema de la inducción de Drm con el sistema Gal80ts/Gal4.** Las larvas se desarrollaron a 25°C hasta tercer estadio temprano (48-72h DEH), en el que se generaron clones mediante un choque térmico a 37°C durante 10 minutos. Tras la generación de los clones, las larvas se dejaron desarrollar a 17°C, temperatura permisiva para la expresión de la proteína Gal80 y por tanto para la represión de la proteína Gal4. Posteriormente, las larvas se incubaron durante diferentes periodos de tiempo (de 7 a 30 horas) hasta el final del tercer estadio larvario a temperatura restrictiva, 29°C, a la cual se reprime la expresión de la proteína Gal 80, permitiendo la expresión de Gal4 y por tanto de Drm (bajo el control del promotor UAS).

Utilizando este sistema y examinando la expresión de marcadores de la vía de Notch y de Wg, hemos podido monitorizar de forma independiente la actividad de ambas vías dentro del mismo periodo de tiempo. La inducción ectópica de Drm durante el tercer estadio larvario, por un periodo inferior a 24 horas, no causa ni sobreproliferación ni la letalidad celular observada en los clones Lines<sup>-</sup>. Por lo tanto, en estos experimentos podemos analizar mejor la expresión de marcadores génicos, indicándonos además que los efectos de sobreproliferación y de letalidad celular ocurren a largo plazo.

El primer efecto que se observa, tras sólo 7 horas después de la inducción de Drm, es la estabilización de Bowl (Figura R.36 A). Cuando han transcurrido 15 horas de inducción de Drm, la expresión de las dianas de Notch; Wg y Ct empieza a detectarse en algunas células del clon y a las 18 horas, ambas dianas están activadas en todas sus células (Figura R.36 B y C). En este mismo periodo de tiempo también hemos observado la represión de la diana de Wg: *sens* a lo largo del borde D/V (Figura R.36 D). La expresión del enhancer VgQE depende de ambas vías; cerca del borde D/V depende de Notch, mientras en células alejadas unos diámetros celulares del borde D/V depende de Wg (Zecca and Struhl, 2007). En los clones *lin<sup>G1</sup>*, la expresión de Vg en los clones que tocan el borde D/V no está afectada, indicando que la vía de Notch está activa; sin embargo, la expresión de Vg está reprimida en clones alejados

del borde, lo que indica que en las células Lines<sup>-</sup> la vía de Wg está inhibida (Figura R.36 E). Como los efectos sobre la expresión de los genes diana de Wg y Notch tienen lugar de forma simultánea, es posible que ambos sucesos ocurran independientemente. Por lo tanto se puede descartar que la represión de Wg sea consecuencia de la activación de Notch.

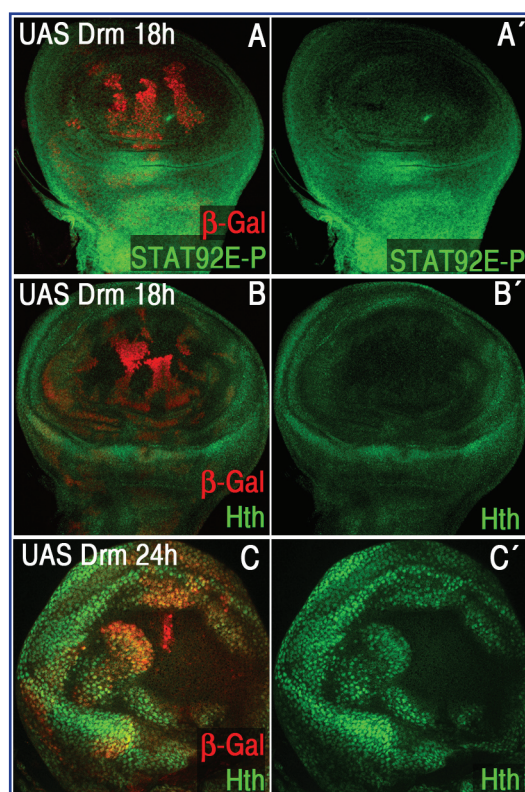


**Figura R.36.** En células Lines<sup>-</sup>, se desregulan simultánea las respuestas de Wg y Notch en el borde D/V.

**A-A'**) Efecto temprano de la inducción de Drm. Clones de sobreexpresión de Drm durante 7 horas, marcados por la presencia de  $\beta$ -Gal (rojo) (A), permiten la expresión de Bowl (verde) (A'). **B-E')** Clones de sobreexpresión de Drm durante 18 horas, marcados por la presencia de  $\beta$ -Gal (rojo), activan la expresión en el borde D/V de Wg (B, B') (paréntesis) y de Cut en las células del borde del clon (C, C'), y reprimen la expresión de Sens de forma autónoma (D, D') (verde). La expresión de Vg (verde E, E') se reprime sólo en aquellos clones alejados del borde D/V (puntas de flecha), en los clones que tocan el borde (asteriscos) la expresión de Vg no se altera.

En este tiempo de inducción, hemos observado además que las células mutantes aún no tienen una proliferación elevada y consecuentemente la vía JAK/STAT no está activada, como se observa analizando la expresión de la forma activa STAT92E-P (Figura R.37A). Además, los clones no han adquirido la forma redondeada característica de los mutantes *lin<sup>G1</sup>*, sino que están integrados en el epitelio, lo cual sugiere que las células no han cambiado aún su identidad. Para confirmar este punto, analizamos la expresión de Hth en clones Drm y observamos que no hay activación tras 18 horas de inducción (Figura R.37 B).

Tras un período de 25-30 horas de inducción de Drm, la expresión de genes específicos de territorios más proximales, como Hth, se activa ectópicamente en regiones distales, lo que indica que empieza a tener lugar la transformación de identidad celular. Unido a este hecho, las células con expresión de Drm proliferan más que las células silvestre y los clones empiezan a adquirir una forma redondeada y a separarse del epitelio tal y como sucede en los clones *lin<sup>GI</sup>* (Figura R.37 C). Estos efectos podrían ser independientes de los efectos observados por la represión de la vía de Wg o la activación de la vía de Notch que tienen lugar antes.



**Figura R.37. Efectos de proliferación y especificación proximal, se generan a largo plazo.**

**A-B')** Clones de sobreexpresión de Drm tras 18 horas de inducción, no activan la expresión de STAT92E-P (verde) (A') y no es suficiente para activar la expresión del marcador proximal Hth (verde) (B'). **C-C')** A partir de 24 horas de inducción de Drm, se activa la expresión de Hth (C') y los clones empiezan a proliferar adquiriendo una forma redondeada. Los clones Drm están marcados con β-Gal (rojo).

### 3.3.- La activación de Notch requiere el reclutamiento de Gro por Bowl.

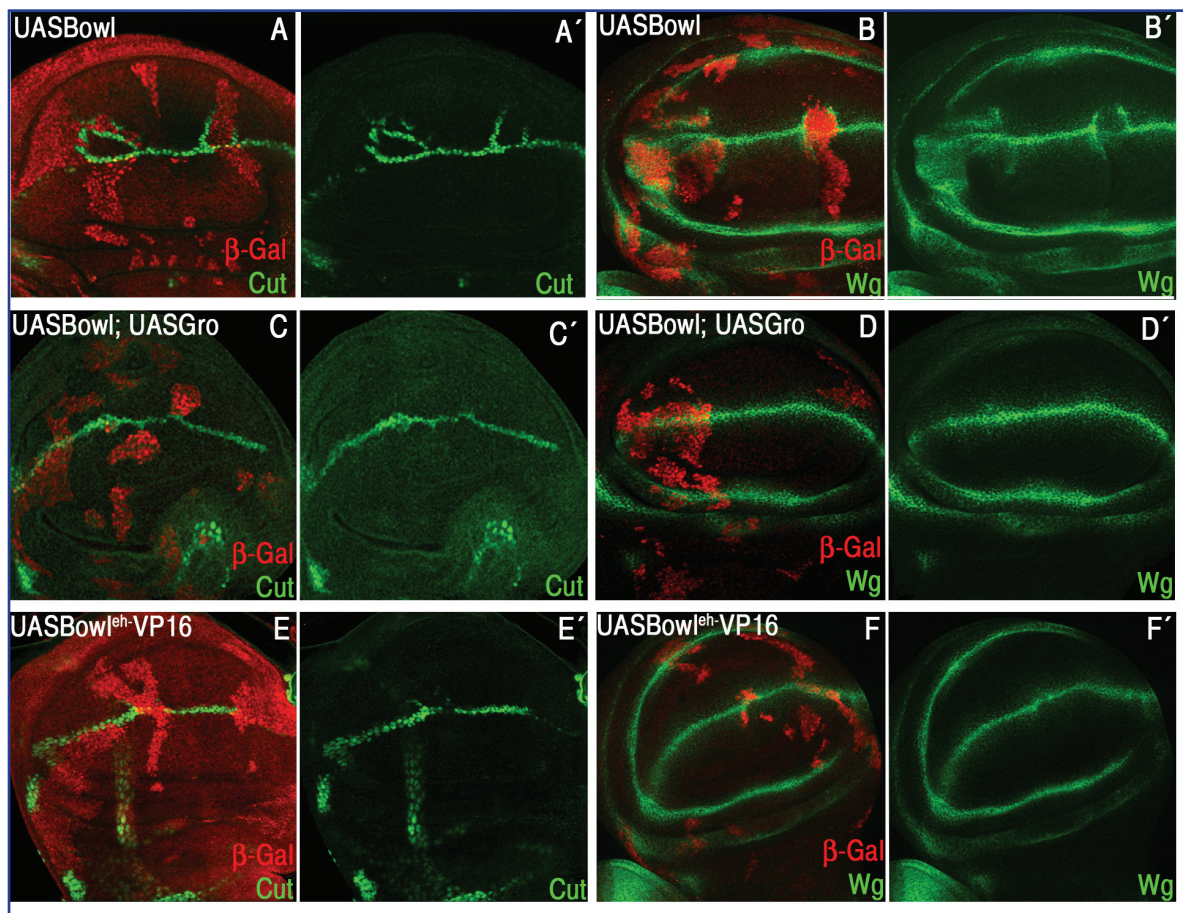
Hasta ahora hemos mostrado que Lines, a través de la represión de Bowl, se requiere para modular las vías de Notch y Wg, y que además, la regulación de ambas vías ocurre de un modo simultáneo. La explicación más sencilla para que ambas regulaciones ocurran al mismo tiempo es que Lines/Bowl regulen la actividad de un componente común a ambas vías. Un componente común de la vía de Notch y Wg es el factor represor Groucho (Gro). Gro no se une directamente al ADN, pero es capaz de interaccionar con un gran número de reguladores transcripcionales a través del motivo conservado engrailed homology-1 (eh-1) o dominio WRPW (Goldstein et al., 2005).

Las secuencias de Odd y Bowl contienen motivos eh-1 por los que se unen al co-represor Gro y regulan de esta manera la expresión de ciertos genes durante la segmentación



del embrión. La eliminación del dominio eh-1 en las proteínas Odd y Bowl conlleva una reducción en la capacidad de unirse a Gro (Goldstein et al., 2005). Es posible que, en el disco imaginal de ala, Lines/Bowl regule las funciones de los complejos en los que Gro participa. Así, en los clones *lin<sup>G1</sup>* la proteína Bowl estabilizada podría interaccionar con Gro secuestrándolo del complejo represor de Notch, cambiando por tanto el estado de represión de las dianas de esta vía.

Para estudiar esta posibilidad analizamos, si la activación de la vía de Notch, debida a la sobreexpresión de Bowl, podía ser contrarrestada mediante la co-expresión de Bowl y Gro. Efectivamente, observamos que la expresión ectópica de Ct y Wg inducidas por Bowl, es normalizada cuando se co-expresan Bowl y Gro en clones inducidos entre 48-72 horas DEH (Figura R.38 A-D).



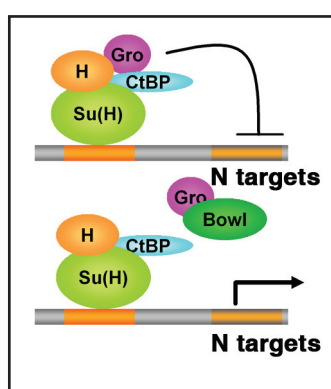
**Figura R.38. La activación de Notch, requiere el reclutamiento de Gro por Bowl.**

**A-B')** Clones de sobreexpresión de Bowl, marcados por la presencia de  $\beta$ -Gal (rojo) activan ectópicamente la expresión de Cut (**A'**) y Wg (**B'**) (ambos en verde). **C-D')** Clones de sobreexpresión doble Bowl/Gro (rojo), restablecen la expresión normal de Cut (**C'**) y Wg (**D'**) (verde), compensando los efectos causados por la expresión ectópica de Bowl. **E-F')** Clones de sobreexpresión de la forma Bowl<sup>eh</sup> VP16 (rojo), no producen la sobreexpresión de Cut (**E'**) y Wg (**F'**) (verde), observada cuando se expresa la forma silvestre de Bowl.



Para comprobar si la capacidad de Bowl para activar las dianas de Notch, depende del motivo de unión a Gro eh-1, generamos una construcción Bowl<sup>Aeh-1</sup>-VP16, en la que eliminamos el dominio eh-1 de su secuencia y lo sustituimos por el activador transcripcional VP-16 (Barolo et al., 2002). La sobreexpresión de Bowl<sup>Aeh-1</sup>-VP16 en clones generados entre 48-72 horas DEH, no tiene *in vivo* los mismos efectos que la sobreexpresión de Bowl (Figura R.38 E y F).

Estos resultados sugieren que la capacidad de Bowl para activar las dianas de Notch depende de su capacidad para interactuar con Gro a través del dominio eh-1, secuestrándolo e impidiendo que forme parte del complejo represor formado por Hairless-CtBP y Su(H) (Modelo Figura R.39).



**Figura R.39. Modelo del reclutamiento de Gro para la activación de la vía de Notch.**

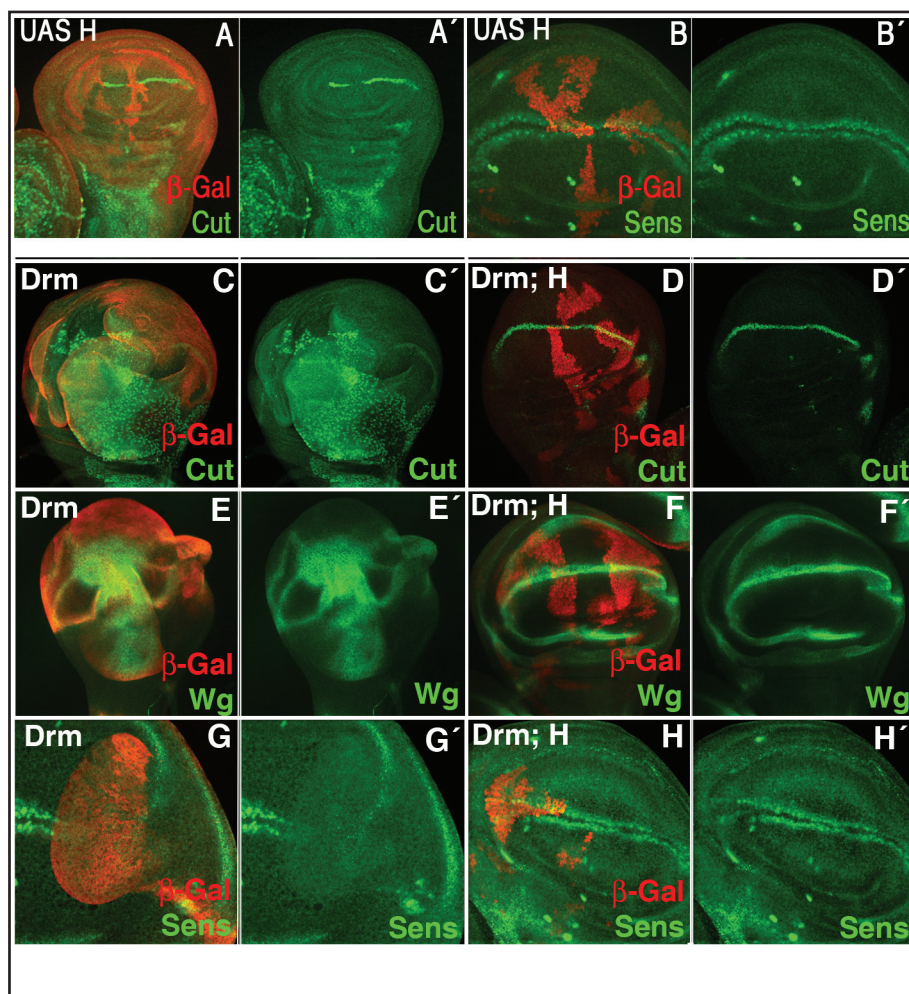
El complejo supresor de Notch está formado por el reclutamiento por Hairless de los co-factores CtBP y Gro y su unión al factor de transcripción Su(H). En ausencia de dichos represores, Su(H) activa la transcripción. La presencia de la proteína Bowl en el núcleo de las células mutantes linG1, podría estar reclutando Gro del complejo supresor y disminuyendo así la capacidad represora del complejo formado junto a Hairless y CtBP.

### 3.3.1.-Hairless, normaliza los efectos de Lines/Bowl en la activación de Notch.

En ausencia de la señal de Notch, la represión de los genes diana es mediada por Hairless, a través de su unión al factor de transcripción Supresor of Hairless (Su (H)) y por el reclutamiento de los co-represores Gro y CtBP (Barolo et al., 2002; Morel et al., 2001). La presencia de Notch desplaza al complejo represor, y Su(H) es capaz de activar la transcripción de los genes diana de esta vía. La activación transcripcional dependiente de Notch es inhibida por la expresión combinada de Su(H) y Hairless, indicando que la unión de Hairless transforma a Su(H) en un represor (Furriols and Bray, 2001; Morel et al., 2001). De acuerdo con estos datos, hemos observado que la sobreexpresión de Hairless en el disco imaginal de ala reprime la expresión de las dianas de la vía de Notch como Cut (Figura R.40 A) pero no tiene ningún efecto en la expresión de Sens, un gen diana de la vía de Wg (Figura R.40B).

Gro media la represión de los genes diana de Notch a través de su unión al complejo Hairless/Su(H)/CtBP. Si la activación ectópica de las dianas de Notch, observada en las células Lines<sup>+</sup>, tiene lugar porque Bowl es capaz de secuestrar Gro de dicho complejo, entonces un aumento de Hairless debería ser capaz de revertir esta situación, es decir, impedir la expresión ectópica de las dianas de Notch causada por Bowl. Para ello, analizamos si la co-expresión de Hairless y Drm era suficiente para suprimir los fenotipos causados por la sobreexpresión de

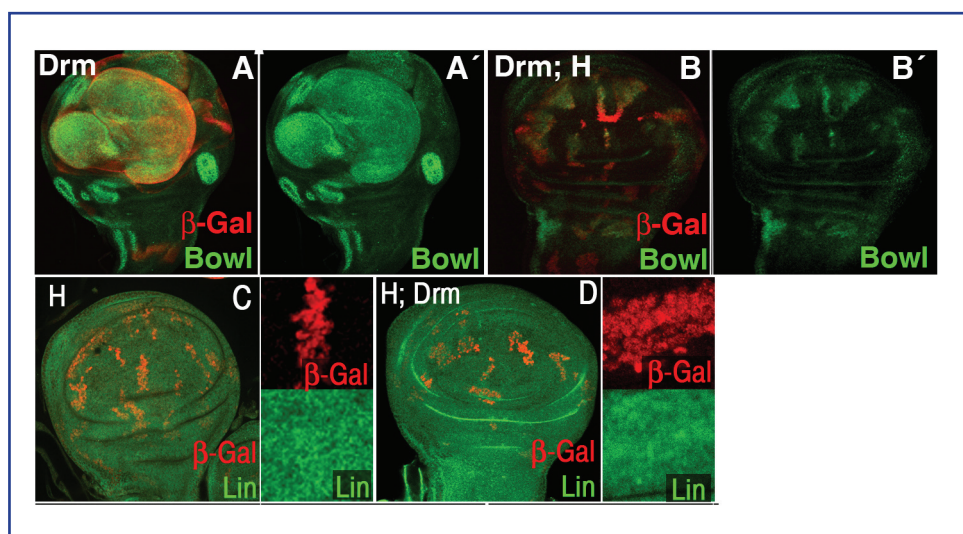
Drm. Sorprendentemente, todas las alteraciones fenotípicas causadas por la sobreexpresión de Drm se suprimen cuando se aumentan los niveles de Hairless. La co-expresión de Drm y Hairless en clones inducidos entre 48-72 horas DEH, revierte tanto la sobreproliferación como la desregulación de las vías de Notch y Wg. Así, en las células de los clones no hay activación ectópica de Cut ni de Wg (Figura R.40 D y F) y la expresión de Sens no es eliminada en los clones situados en el borde D/V (Figura R.40 H), y tampoco se detecta un aumento en los niveles de proteína STAT92E en estas células mutantes.



**Figura R.40. Hairless suprime los fenotipos causados por la expresión ectópica de Drm.**

A-B') La expresión ectópica de Hairless, marcada por la presencia de  $\beta$ -Gal (rojo) reprime la expresión de Cut (verde) (A') pero no altera la expresión de Sens (B'). C-D') La expresión ectópica de Cut (verde) en clones de sobreexpresión de Drm (C), es revertida en los clones Drm/Hairless (D). E-F') La expresión ectópica de Wg (verde) en clones de sobreexpresión de Drm (E) es revertida en los clones dobles Drm/Hairless (F). G-H') Del mismo modo, la represión de Sens (verde) en clones Drm (G) es revertida en los clones Drm/ Hairless (H).

En el apartado 3.2, utilizando el sistema Gal80<sup>ts</sup>, hemos mostrado que tras la inducción de Drm durante 7 horas, el primer evento es la estabilización de la proteína Bowl en el núcleo. Esta estabilización de Bowl no es impedida presencia de Hairless (Figura R.41 A y B), a pesar de que los efectos de Bowl son suprimidos por Hairless. De acuerdo con el modelo propuesto, Hairless y Bowl podrían competir por la unión al factor Gro, disminuyendo la cantidad de Gro disponible para formar parte del complejo represor H/ Su(H). Por otra lado, observamos que en los clones dobles *UAS-drm+UAS-hairless*, Lines no es relocalizada al citoplasma, al contrario de lo que ocurre en los clones de sobreexpresión de Drm (Figura R.41 C y D). Este resultado sugiere que Hairless podría estar compitiendo con Drm por la unión a Lines impidiendo su relocalización.



**Figura R.41. Bowl y Lines colocalizan en presencia de Hairless.**

**A-B´)** La expresión ectópica de Bowl (verde), observada en clones Drm (A) se mantiene en los clones Drm/ Hairless (B). **C)** La sobreexpresión de Hairless, no afectan a la localización subcelular de Lines (verde). **D)** Clones Drm/ Hairless, no relocalizan Lines al citoplasma (verde). Todos los clones de sobreexpresión se marcaron por la expresión de β-Gal (rojo). Comparar con la figura R20 A, donde Lines se localiza en el citoplasma de las células que expresan Drm.

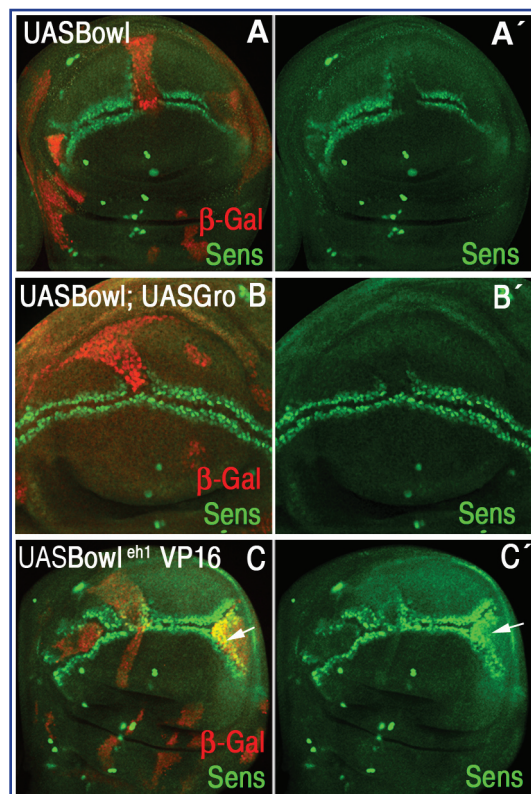
Es de destacar que Hairless ha sido caracterizado como un represor específico de la vía de Notch y sin embargo, los resultados indican que la sobreexpresión de Hairless también puede revertir la represión de las dianas de la vía de Wg en los clones de ectópica de Drm.

### **3.4.- La represión de las dianas de la vía de Wg implica la cooperación entre Gro y Bowl.**

Como hemos visto, el reclutamiento de Gro por Bowl y los consecuentes efectos sobre el complejo represor Hairless-Su(H) podría explicar la activación de los genes de la vía de Notch. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que Bowl también es capaz de reprimir la vía de Wg (ver apartado 3.1).



Se ha descrito que en ausencia de la señal Wg, Gro se une a dTcf, el efector transcripcional de Wg, para reprimir la transcripción de los genes diana de la vía (Cavallaro et al., 1998; Lawrence et al., 2000). Por tanto, si la unión Bowl/Gro contribuyera a esta represión, la represión de la vía de Wg observada en clones de falta de *lines* podría estar mediada por Gro.



**Figura R.42. La represión de las dianas de Wg implica la cooperación de Bowl y Gro.**

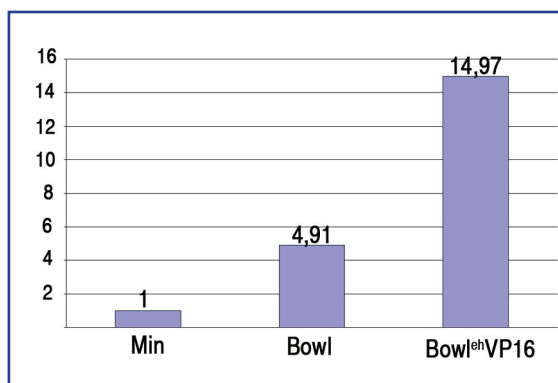
**A, A')** Clones de sobreexpresión de Bowl, reprimen la expresión de Sens (verde). **B, B')** Clones de sobreexpresión de Bowl/Gro, reprimen la expresión de Sens (verde). **C, C')** Clones de sobreexpresión de la forma Bowl<sup>eh1</sup> VP16, activan la expresión de Sens (verde y flechas). En todos los casos las células que sobreexpresan las diferentes combinaciones de los transgenes fueron marcadas por la presencia de β-Gal (rojo).

Para analizar la posible contribución de Gro en la represión de la vía de Wg en estas condiciones, co-expresamos Bowl y Gro en clones inducidos entre 48-72 horas DEH y observamos que dicha co-expresión tiene el mismo efecto en la represión de las dianas de Wg que cuando expresamos por separado tanto Bowl como Gro (Figura R.42 A y B).

Seguidamente, analizamos el efecto sobre la vía de Wg de la sobreexpresión de la forma Bowl<sup>Δeh1</sup>-VP16, que no puede unirse a Gro. En estos clones no sólo no hay represión sino que se activa ectópicamente Sens (Figura R.42 C). Esta activación se debe probablemente a la capacidad activadora del factor VP-16.

Para comprobar la capacidad activadora de Bowl<sup>Δeh1</sup>-VP16 así como la capacidad de unión de Bowl a secuencias reguladoras, generamos un vector que contiene varias repeticiones en tandem de la secuencia a la que se une el factor de transcripción Odd, a la que hemos denominado **O**dd **b**inding **s**ite (OBS), en el vector pGL3 MIN que lleva unido el gen reportero luciferasa (ver materiales y métodos). Realizamos ensayos de co-transfección de dicho vector junto a las construcciones *UAS-bowl* o *UAS-bowl*<sup>Δeh1</sup>-VP16 en células S2, en presencia de la proteína Gal4. Monitorizamos la actividad luciferasa en los extractos celulares de ambas co-transfecciones (Bowl versus Bowl<sup>Δeh1</sup>-VP16). Los

resultados confirman la capacidad de Bowl de unirse al ADN, y la capacidad activadora del híbrido Bowl $\Delta$ eh1-VP16, hasta 3,4 veces mayor que en las células que expresan la forma silvestre de Bowl (Figura R.43).

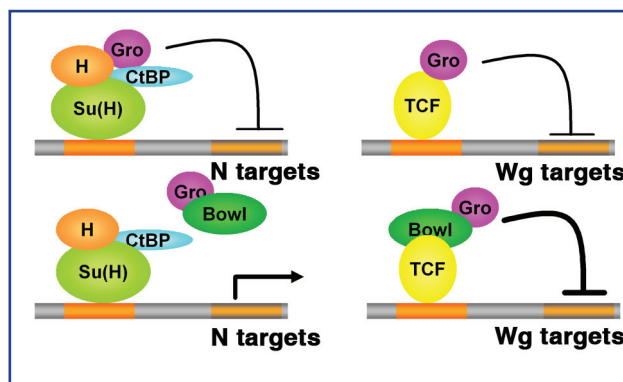


**Figura R.43. La substitución del dominio eh1 de Bowl por la proteína viral VP16, convierte a Bowl en un activador.**

Ensayo de actividad luciferasa en células S2 transfectadas con las construcciones Bowl o Bowl<sup>eh</sup>VP16 y un vector Min, que contiene en la región del promotor secuencias en tandem del motivo de unión a Odd y el gen reportero de la luciferasa. Los valores están medidos en Unidades Relativas de Luz (RLU) y normalizados frente a los valores obtenidos en la transfección del vector Min sólo.

Estos datos indican que Bowl puede funcionar como un represor transcripcional de la vía de Wg uniéndose a Gro para formar un complejo represor.

Como conclusión de todos estos resultados sugerimos que los diferentes efectos de Lines/Bowl en la regulación de las vías de Wg y Notch son el resultado del secuestro de Gro, componente crítico para la represión de las dianas de Notch, y de la contribución positiva de Bowl/Gro en la represión de las dianas de Wg (modelo Figura R.44).



**Figura R.44. Modelo del reclutamiento de Gro para la activación de la vía de Notch y represión de la vía de Wg.**

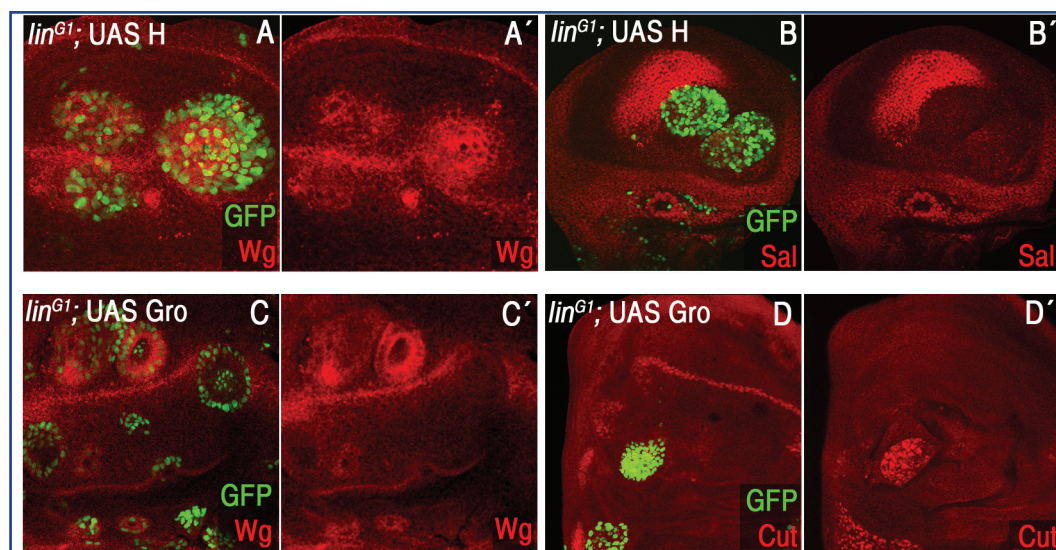
La estabilización de Bowl en el núcleo de las células de falta de lines, resultaría en el reclutamiento de Gro desde el complejo represor de Notch, produciendo la activación de esta vía. Por otro lado, la unión Bowl-Gro formaría así un complejo represor capaz de unirse a dTcf que contribuiría a la represión de los genes diana de la vía de Wg.

### 3.5.- Lines se requiere como un factor modular en los complejos transcripcionales que regulan las vías de Notch y de Wg.

En el apartado 3.3.1, hemos mostrado que Hairless es capaz de retener a Lines en el núcleo a pesar de la presencia de Dm (Figura R.41). Este resultado abre la posibilidad de que Lines pueda formar parte del complejo represor formado por Hairless/Gro/CtBP.

Para investigar esta posibilidad analizamos clones MARCM inducidos entre 48-72 horas DEH que sobreexpresan Hairless en clones *lin<sup>G1</sup>*. En estas condiciones la sobreexpresión de Hairless no es capaz de suprimir los fenotipos *lin<sup>G1</sup>*, ni la sobreproliferación ni la desregulación de la vía de Notch; ya que estas células mutantes presentan expresión ectópica de Ct y Wg (Figura R.45A y B). Estos resultados sugieren que la presencia de Lines se necesita para que Hairless pueda suprimir los fenotipos debidos a la estabilización de Bowl en el núcleo.

Si esta suposición es cierta, entonces la sobreexpresión de Gro en clones *lin<sup>G1</sup>* tampoco podría revertir totalmente los efectos causados por la estabilización de Bowl. Cuando analizamos en clones MARCM inducidos entre 48-72 horas DEH el efecto de sobreexpresar de Gro en células *lin<sup>G1</sup>*, observamos que los fenotipos *lin<sup>G1</sup>* no se suprimen. La falta de *lines* hace que Cut y Wg se sigan expresando ectópicamente pese a la presencia Gro (Figura R.45C y D).



**Figura R.45. Lines se requiere para modular las respuestas de Notch y Wg.**

**A-B')** Clones MARCM mutantes *linG1* con sobreexpresión de Hairless. Los clones marcados por la presencia de GFP (verde) expresan ectópicamente Wg (rojo) (A') y reprimen la expresión de Sal (rojo) (B'). **C-D')** Clones MARCM de sobreexpresión de Gro en células *linG1*. Los clones marcados por la presencia de GFP (verde) expresan ectópicamente Wg (C') y Cut (D') (rojo). Nótese que la expresión de Hairless o Gro, no rescata los fenotipos *linG1*.



Para analizar la interacción de Lines con el complejo represor Hairless/Gro/CtBP realizamos una búsqueda de posibles motivos de unión a Gro en la secuencia de Lines, y encontramos motivos eh-1 en el extremo 3' (Tabla R.1).

Especie	Secuencia consenso: (FY)X(IVL)XX(IL)(ILV)
Anopheles	FPYNITPILRL
Culex	FPYNIGPILRL
mouse	FPYNPAALLKL
<i>Drosophila</i> <i>hairless</i>	Y <b>SI</b> HSL
<i>Drosophila</i> <i>lines</i>	YP <b>Y</b> DISPVLRL

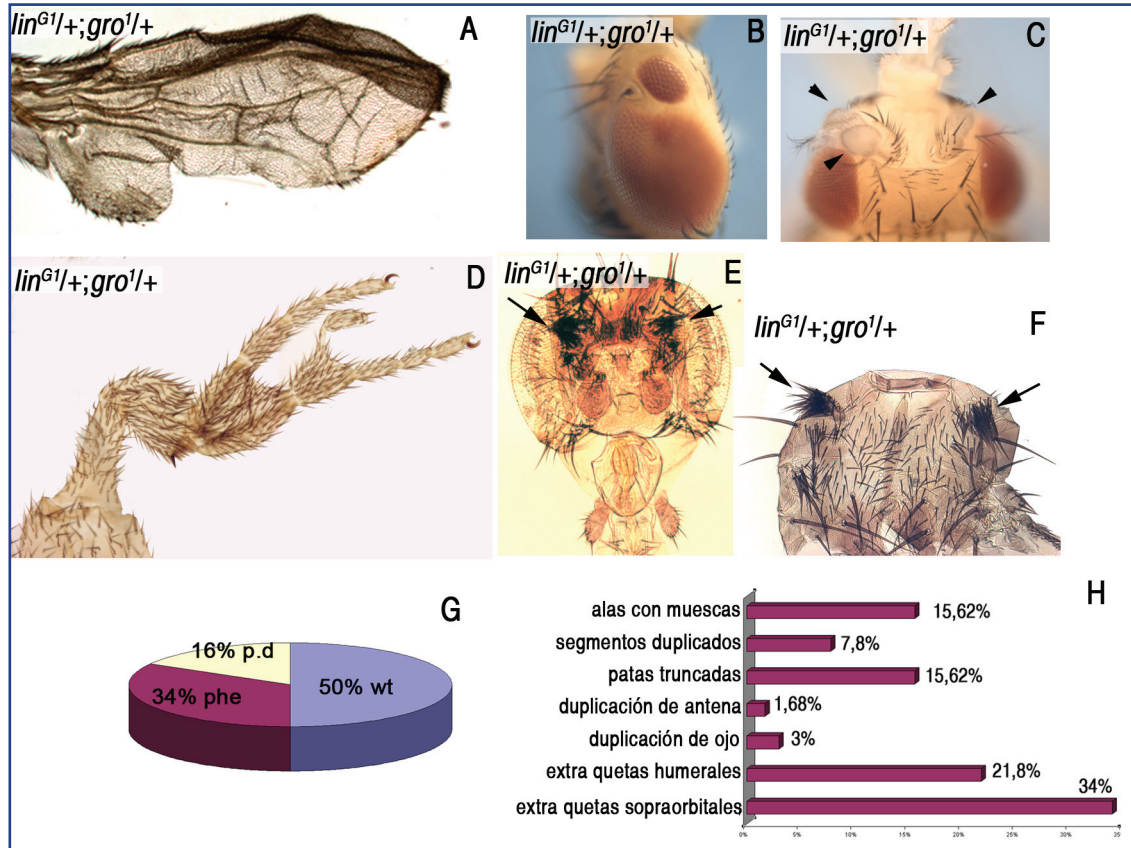
Tabla R.1 Conservación del motivo eh1

Esta secuencia de unión a Gro, presenta un alto grado de conservación con la secuencia consenso (FY)X(IVL)XX(IL)(ILV), obtenida a partir de la comparación de secuencias en varias especies (Tabla R.1). Es posible entonces que en condiciones silvestres, Lines pueda formar parte del complejo represor de Notch a través de la interacción con Gro, previniendo la relocalización de Gro hacia otros complejos represores.

Si el modelo propuesto a partir de los resultados obtenidos fuese correcto, entonces deberíamos encontrar una interacción genética entre *lines* y *gro*. Para testar esta hipótesis, analizamos el fenotipo de individuos adultos dobles heterocigotos para *lin<sup>G1</sup>* y *gro<sup>l</sup>*. Observamos que la mutación *lin<sup>G1</sup>* en heterocigosis aumenta la letalidad de *gro<sup>l</sup>*. El 50% de los individuos presentan fenotipo silvestre, del 50% restante, un 16 % mueren en el estadio de pupa y el 33% de los individuos que alcanzan la fase adulta, muestran una combinación de fenotipos mutantes *lin<sup>G1</sup>* y *gro*. Estos fenotipos consisten en la aparición de ojos ectópicos, duplicaciones de patas, acortamiento de los tarsos y de la probóscide y duplicación de las antenas, como habíamos observado en los clones mutantes *lin<sup>G1</sup>*. La combinación de la mutación *lin<sup>G1</sup>* con *gro<sup>l</sup>* también produce fenotipos *gro*, como son el aumento del número de quetas en la cabeza y muescas en los bordes del ala (Figura R.46).

La fuerte interdependencia de Gro y Lin/Bowl, refuerza la posibilidad de que Lines forma parte del complejo represor Gro/Hairless/CtBP.

En las combinaciones heteroalelicas *lin/+*; *gro/+* se puede apreciar que la interacción genética entre *lines* y *gro* no sólo se manifiesta en las alas sino en todas las estructuras del adulto. Esta observación concuerda con el hecho sorprendente de que Hairless y en cierta medida Gro suprime los fenotipos de los clones ectópicos de Dm en otros discos imaginales, tales como los descritos en la pata, o en el ojo (datos no mostrados).



**Figura R.46. Fenotipos adultos en individuos dobles mutantes *lines/gro*.**

**A-F)** Fenotipos de los individuos adultos de la combinación en heterocigosis *linG1/+; gro1/+*. **A)** Fenotipo de ala adulta mostrando deficiencia en el crecimiento y muescas en el borde del ala. **B)** Duplicación de ojo. **C)** Duplicación de antena, las puntas de flecha marcan las aristas. **D)** Duplicación de pata y acortamiento de segmentos tarsales. **E)** Aparición de mechones de extraquetas supraorbitales y **F)** extraquetas humerales, ambos fenotipos son característicos del efecto neurogénico debido a la falta de *gro*. **G)** Porcentaje de individuos que muestran fenotipos. **H)** Representación de los porcentajes de individuos del cruce con los distintos fenotipos.

Discusión

En esta Tesis hemos analizado la función de *lines* durante el desarrollo imaginal. Utilizando un alelo nulo (*lin<sup>GI</sup>*) y dos transgenes, uno que expresa el ARN interferente de *lines* y el ADNc hemos analizado los fenotipos causados por de falta y exceso de función respectivamente tanto en la cutícula del insecto adulto como en el disco imaginal analizando la expresión de diferentes marcadores genéticos. A continuación se discuten los resultados más relevantes derivados del trabajo experimental descrito en los apartados anteriores.

### ***1.-lines se requiere durante el desarrollo imaginal.***

El estudio de la función de *lines* durante el desarrollo imaginal muestra que *lines* se requiere en diferentes etapas y tejidos para el correcto desarrollo de las estructuras cuticulares.

La proteína Lines se expresa en los discos imaginales (ala, pata, ojo-antena y genitalia) que van a dar lugar a las correspondientes estructuras cuticulares adultas lo que sugiere que su función es necesaria para el correcto desarrollo de tales estructuras. La diferente localización subcelular de la proteína en los discos imaginales en las distintas regiones dentro de un mismo disco imaginal es esencial para ejercer su función. Se había sugerido que Lines se une a factores de transcripción (Castelli-Gair, 1998; Hatini et al., 2000), de modo que la localización nuclear de la proteína indica donde es funcional, mientras que en aquellas regiones donde la proteína se encuentra en el citoplasma su función estará inhibida. Tomando como ejemplo el disco de ala, la expresión generalizada de Lines, con una localización nuclear y citoplasmática en todo el epitelio imaginal, indica que su función es necesaria para el correcto desarrollo de las diferentes estructuras derivadas de este disco, mientras que la localización citoplasmática de la proteína en la membrana peripodial y en las células cuboidales del margen, sugiere que Lines no es funcional en dichos epitelios. El requerimiento de la función de Lines en todo el epitelio imaginal del ala queda patente por los efectos fenotípicos causados por los clones de falta de función *lin<sup>GI</sup>*.

### ***2.-lines tiene una función dinámica en el desarrollo imaginal de ala.***

El estudio fenotípico de la falta de *lines* indica un requerimiento espacio-temporal del gen en los diferentes estadios larvarios. Esta característica ha sido sin duda una de las mayores dificultades a la hora de caracterizar la función del gen *lines* durante el desarrollo imaginal. De los fenotipos analizados en clones de falta de función de *lines* en la cutícula del adulto y en los discos imaginales podemos concluir:

1°.-Las células mutantes no sobreviven cuando la función de *lines* se elimina en etapas muy tempranas del desarrollo.

2°.-La falta de *lines* en estadios intermedios del desarrollo tiene efectos autónomos

sobre la proliferación celular. Cuando la falta de *lines* tiene lugar en el territorio presuntivo de ala, se forman vesículas que tienden a segregarse del epitelio. Algunas de estas vesículas completan el desarrollo hasta el individuo adulto, diferenciando OS ectópicos que son característicos de otras regiones o discos imaginales. Estos fenotipos sugieren que la función de *lines* en este período debe estar modulando diferentes señales que afectan a la proliferación y la especificación celular.

3º.- Tardíamente, la falta de *lines* tiene efectos no autónomos sobre la proliferación celular de modo que, es capaz incluso de generar duplicaciones de diferentes regiones del disco imaginal, dependiendo de la posición donde se origine la falta de *lines* que se corresponden con los fenotipos cuticulares observados en el adulto. Estos efectos no autónomos generan estructuras completas en menos de 48 horas, hecho que recuerda a los fenotipos causados por regeneración después de un daño provocado en un disco imaginal (revisado en Maves and Schubiger, 2003). Las zonas del disco que son capaces de inducir regeneración después de una lesión o herida se denominan “puntos débiles” (Bosch et al., 2005; Lee et al., 2005). Se ha descrito que las células que sufren un proceso de regeneración activan la vía de JNK (Lee et al., 2005).

En este contexto hemos observado que es en estas zonas es donde la falta de *lines* produce duplicaciones completas de los diferentes territorios que derivan del disco de ala, y hay activación ectópica de *puc* que es un gen diana de la vía JNK (Martin-Blanco et al., 1998).

### ***3.-lines es necesario para la correcta especificación de los territorios dentro del disco de ala.***

Los clones redondeados *lin<sup>GI</sup>*, completan el desarrollo como “bolitas” de tejido mutante situadas entre las superficies dorsal y ventral del ala adulta. Este tejido mutante suele desarrollar OS, lo que indica un cambio en la identidad de estas células. Así, la forma redondeada indica que las células mutantes dentro del territorio presuntivo de ala reespecifican su identidad, y proliferan minimizando el contacto con células silvestres vecinas. Descartamos que las células *lin<sup>GI</sup>* en el ala hubiesen adquirido la identidad de otros discos imaginales, como puede ser halterio, pata u ojo-antena, analizando la expresión de marcadores genéticos que se expresan específicamente en dichos discos imaginales como Ubx (en halterio) o Bab y Dac (en los discos ventrales). Por tanto, concluimos que las células mutantes cambian su identidad de dentro del disco imaginal de ala. De este modo, nos centramos en estudiar la actividad de las principales vías de señalización que participan durante la formación del ala en las células mutantes *lines*.

Se sabía que el gen *lines* modulaba la respuesta celular a la señal de Wg durante el desarrollo embrionario (Bokor and DiNardo, 1996; Hatini et al., 2000). Dado que en el disco imaginal de ala Wg es una de las vías de señalización que dirige la especificación de territorios

a lo largo del eje P/D, quisimos estudiar, en este contexto, si *lines* modulaba la respuesta a Wg. El estudio de la expresión de diferentes marcadores génicos en clones *lin<sup>G1</sup>* generados en el territorio presuntivo de ala entre 48-72 horas DEH, nos desveló la activación ectópica de marcadores correspondientes a territorios proximales del ala (Hth, Zfh-2 y Tsh), al mismo tiempo que la pérdida de expresión de marcadores distales (Nub y Vg). Los cambios en la expresión de estos marcadores en las células mutantes *lines* nos indicaba que la vía de Wg estaba reprimida. Sin embargo, sólo la falta de respuesta a la vía de Wg no era suficiente para explicar todos los fenotipos observados en las células *lin<sup>G1</sup>*.

Otro de los eventos tempranos en la determinación de la identidad de ala frente a notum, es la mutua represión entre las vías de Wg y la vía EGF-R (Zecca and Struhl, 2002b). Hemos visto que en células *lin<sup>G1</sup>* existe una activación anormal de la vía de EGF-R confirmada por la expresión ectópica de genes diana como Kekkón, C-Iro y la forma fosforilada de MAPK. Por tanto, los cambios de identidad P/D podrían deberse no sólo a la represión de la vía de Wg, sino también a la activación ectópica de la vía de EGF-R.

El análisis de los marcadores genéticos que se expresan en diferentes subdominios del ala sugiere que los cambios de identidad P/D observados en las células *lines* podrían deberse a un cambio de su identidad de células del epitelio hacia las células cuboidales que van a dar lugar a la pleura o al hinde ventral del adulto. Los marcadores Zfh-2, Tsh, Hth e Iro-C que se encuentran activados ectópicamente en los clones *lin<sup>G1</sup>* inducidos entre 48-72 horas DEH, se expresan en condiciones silvestres en las células cuboidales del disco imaginal de ala. Alternativamente, la activación ectópica de estos marcadores puede indicar un cambio de identidad hacia territorios más proximales dentro del epitelio del disco propio, aunque no hemos encontrado la expresión en los clones *lin<sup>G1</sup>* de marcadores como *panier* (*pnr*) que definen el dominio más proximal del disco de ala dentro del territorio de notum.

La vía de Dpp, además de controlar el patrón morfogenético del ala a lo largo del eje A/P también regula la proliferación y el crecimiento celular del disco imaginal. Aunque la falta de *lines* no afecta a la identidad celular a lo largo del eje A/P, como hemos visto analizando la expresión de marcadores como En, sí altera la expresión de algunos genes diana de la vía de Dpp. Al contrario de lo que ocurre con la vía de Wg, donde todas las dianas están afectadas en células *lin<sup>G1</sup>*, la falta de *lines* sólo desregula la expresión de dos dianas de la vía de Dpp: *sal* y *brk*. Mientras la expresión de *sal* está reprimida, la de *brk* es activada ectópicamente en dichos clones. La activación de Brk en los clones *lin<sup>G1</sup>* podría deberse a un efecto secundario del cambio de identidad a territorios más proximales observado en dichas células, ya que al igual que los marcadores descritos anteriormente, Brk se expresa en condiciones silvestres en las células cuboidales del disco de ala (Gibson and Perrimon, 2005; Shen and Dahmann, 2005). Alternativamente, y dado que Brk se activa en el borde entre dos poblaciones de células con ratios de proliferación diferentes (Moreno et al., 2002), la activación de Brk en los clones *lin<sup>G1</sup>*, podría deberse a la diferencia de proliferación observada entre las células mutantes y



silvestres. En ambos casos, la represión de *sal* en las células *lin<sup>G1</sup>* puede ser una consecuencia directa de la expresión ectópica de Brk ya que a diferencia de *dad*, *omb* o el propio *dpp*, *sal* es reprimido directamente por Brk sin necesidad de unirse este a otros co-represores (Hasson et al., 2001).

#### ***4.-lines regula la proliferación celular y la apoptosis.***

Una segunda característica de las células mutantes *lines* es la elevada proliferación respecto a las células silvestres. Además de las vías de señalización de Wg y Dpp, que son responsables tanto del patrón morfogénico como de la proliferación de las células, hemos mostrado que las células *lin<sup>G1</sup>* expresan altos niveles de las formas activadas de las proteínas STAT y MAPK, que indica la activación de las vías JAK/STAT y Ras/MAPK, respectivamente. Ambas vías podrían contribuir a la sobreproliferación observada cuando se induce la falta la función de *lines*.

A pesar de la elevada proliferación, estas células mutantes no alcanzan el estadio adulto porque inician un proceso apoptótico, como indica la expresión ectópica de Caspasa-3 activada y *puc-LacZ*. Esta muerte celular puede ser debida a la activación ectópica de Brk, ya que altos niveles de Brk activan la vía JNK y por consiguiente inician el programa apoptótico (Moreno et al., 2002), o bien una consecuencia directa de la elevada tasa de proliferación de las células mutantes debido a fallos en la recepción de señales de supervivencia para su mantenimiento causada por la pérdida de contacto con las células silvestres vecinas. El hecho de que el programa apoptótico se active en las células mutantes *lines*, explica que los clones generados en etapas tempranas del desarrollo no sobrevivan y sólo quede como testigo la existencia de las células del clon gemelo tanto en el disco imaginal como en la cutícula del adulto.

Por tanto, los fenotipos causados por la falta de *lines* implican cambios en las vías de Wg, Dpp, EGF-R, JAK/STAT, y revelan que la función de *lines* es fundamental en la regulación de la actividad de diferentes vías de señalización que controlan la proliferación celular durante el desarrollo imaginal.

#### ***5.-lines regula el mantenimiento del borde D/V modulando la actividad de las vías de Wg y Notch***

Uno de los efectos más relevantes de los clones *lin<sup>G1</sup>* es la transformación de identidad celular a lo largo del eje P/D debido a cambios en la actividad de la vía de Wg y EGF-R, dos señales antagónicas responsables de la decisión temprana entre ala y notum (Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002b). Sin embargo, ni la represión de la vía EGF-R sobreexpresando el transgen *Raf<sup>DN</sup>*, ni la activación de la vía de Wg sobreexpresando *Arm<sup>S10</sup>*, son capaces de

rescatar todos los fenotipos *lin<sup>G1</sup>* sugiriendo que otras señales deben estar implicadas en los defectos observados.

Más tarde en el desarrollo, la vía de Wg es responsable desde el segundo estadio larvario de la especificación de territorios dentro del región presuntiva del ala (Whitworth and Russell, 2003). En este período la actividad de Wg está regulada en parte por la señal de Notch en el borde D/V. Notch es capaz de activar a *wg* excepto en las células del borde D/V debido a la expresión de Cut. Ambas señales actúan sinérgicamente para promover el crecimiento y la supervivencia del primordio de ala (Buceta et al., 2007; de Celis and Bray, 1997; Klein and Arias, 1998; Micchelli et al., 1997). La activación observada de la vía de Notch en los clones *Lines<sup>-</sup>* podría explicar la represión de la vía de Wg, pese a la expresión ectópicamente de Wg en estas células, ya que Cut es capaz de reprimir la vía de Wg a nivel de Arm (Buceta et al., 2007). Sin embargo, hemos mostrado que la sobreexpresión de Arm<sup>S10</sup> no rescata los fenotipos causados por la falta de *lines*, indicando que *Lines* está actuando en la vía de Wg en paralelo o por debajo de a Arm.

Por otra parte, la activación de las dianas de Notch (Wg y Cut) y la represión de las dianas de Wg (*Sens*) ocurren simultáneamente, sugiriendo que *Lines* funciona independientemente como un modulador sobre cada una de ellas en las células del borde D/V. Estos experimentos también nos han permitido mostrar que los cambios de proliferación y de identidad celular observados en las células *Lines<sup>-</sup>* son posteriores a la modulación de la vía de Notch y Wg.

Las vías de Notch y de Wg representan dos de los principales canales de comunicación intercelular usados por las células durante el desarrollo, y las actividades de ambas vías están interrelacionadas en diferentes contextos del desarrollo tales como la especificación de la banda germinal de los erizos de mar (Angerer and Angerer, 2003; McClay et al., 2000; Sherwood and McClay, 2001; Sweet et al., 2002), el desarrollo de los precursores de la piel (Estrach et al., 2006), la formación de los rombómeros (Cheng et al., 2004) y la somitogénesis en vertebrados (Aulehla and Herrmann, 2004; Aulehla et al., 2003; Pourquie, 2003).

## **6.-La función reguladora de la red génica *Drm/Lines/Bowl***

La siguiente pregunta a responder es si *Lines* durante el desarrollo imaginal del ala esta funcionando dentro de la vía *Drm/Lines/Bowl* del mismo modo que se ha descrito en el embrión (Green et al., 2002; Hatini et al., 2000; Hatini et al., 2005; Johansen et al., 2003). La red génica formada por *Drm/Lines/Bowl* está emergiendo como una nueva vía de regulación que actúa durante el desarrollo en la formación de patrones de diferenciación (de Celis Ibeas and Bray, 2003; Hao et al., 2003; Hatini et al., 2005). Se ha demostrado que las tres proteínas *Drm/Lines/Bowl* interaccionan física y funcionalmente. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario de la epidermis, las interacciones competitivas proteína-proteína entre *Lines* y *Bowl* o entre *Drm* y *Lines* en el núcleo, regulan el estado de acumulación de la proteína *Bowl* que es el efector final de esta vía reguladora (Hatini et al., 2005). El funcionamiento de esta

red génica también se ha observado en otros contextos el desarrollo, como en la diferenciación epidérmica, el desarrollo morfogenético del intestino, la formación de las estructuras distales y de las articulaciones de las patas o la formación del ojo (Iwaki et al., 2001; Green et al., 2002; de Celis Ibeas and Bray, 2003; Johansen et al., 2003; Hatini et al., 2005; Bras-Pereira et al., 2006).

El ARNm de *bowl* se expresa en todas las células del disco de ala, sin embargo la proteína Bowl sólo se detecta en aquellas células donde Lines está localizado en el citoplasma. La eliminación de la función de *lines* en cualquier parte del disco imaginal, permite la acumulación de Bowl. Ambas observaciones indican que la presencia de Lines en el núcleo impide la acumulación de Bowl. En el disco imaginal de ala, Bowl es el efector principal de los cambios observados en los clones *lin<sup>GI</sup>*; ya que los fenotipos de falta de función de *lines* causados por la expresión del transgen *UAS-linesARNi* son revertidos cuando se co-expresa la forma *UAS-bowl ARNi*. De la misma manera, los clones dobles mutantes para *bowl* y *lines* no dan lugar a la característica proliferación de los clones sólo mutantes para *lin<sup>GI</sup>*. Todos estos resultados indican que la acumulación de Bowl en las células *lin<sup>GI</sup>* es la responsable de los fenotipos observados en las células mutantes.

El patrón de expresión de la proteína Bowl coincide con el del ARNm de *drm*, en todos los disco imaginales examinados. Los resultados obtenidos a partir de experimentos realizados *in vivo* e *in vitro*, muestran que la proteína Drm regula los niveles de Lines en el núcleo desplazándola hacia el citoplasma y esta relocalización de Lines permite que la proteína Bowl se acumule en el núcleo. Por eso la expresión ectópica de Drm es capaz de bloquear la regulación negativa que ejerce Lines sobre Bowl, y reproduce los fenotipos causados por la falta de *lines* tanto en identidad celular como en proliferación.

### **7.-Mecanismo de regulación de los niveles de proteína Bowl**

En otros procesos en lo que *lines* interviene durante el desarrollo, se ha demostrado que Lines regula a Bowl post-transcripcionalmente, promoviendo directa o indirectamente la degradación de Bowl. Nuestros datos en el disco imaginal de ala indican que también sucede así; Bowl se acumula en el núcleo tras 6 horas de la inducción de la inhibición de Lines, y este tiempo no es suficiente para que la proteína Bowl se traduzca. Los ensayos *in vitro* corroboran estos resultados y muestran que la presencia de Lines, hace que el nivel de la proteína Bowl disminuya en las células S2. Por tanto, Lines impide la acumulación de Bowl en las células del disco imaginal mientras que Drm favorece la acumulación de Bowl, actuando sobre la relocalización subcelular de Lines.

Durante el desarrollo del disco de ala, Bowl se acumula en las células de la membrana peripodial, donde Lines se localiza en el citoplasma. De esta forma Lines especificaría las células del disco propio y Bowl regularía la determinación de la membrana peripodial. La

presencia de Bowl en estas células sería uno de los eventos modulados por Lines durante el desarrollo temprano del disco (comunicación personal; Hatini, V., 2007).

La expresión espacial de los otros dos genes de la familia Odd-Skipped, *odd* y *sob* coincide en las mismas células que Drm, sugiriendo que estos genes podrían también actuar favoreciendo la acumulación de Bowl e inhibiendo la función de Lines. Si bien hemos demostrado que en el disco imaginal de ala Odd y Sob permiten la acumulación de Bowl, sin embargo no son capaces de desplazar a Lines al citoplasma. También hemos probado que Odd y Sob son capaces de formar complejos proteicos con Bowl, de modo que un posible mecanismo por el que estas proteínas podrían inhibir la degradación de Bowl por Lines sería que la formación de estos complejos impidiera la interacción Lines-Bowl.

En el disco imaginal de pata, Bowl regula la expresión de su parálogo Odd (tesis doctoral del Dr.J.de Celis, 2001). Nosotros hemos mostrado que la estabilización de Bowl permite la transcripción de los genes *drm*, *odd* y *sob* en el disco imaginal de ala sugiriendo que Bowl podría estar regulando directamente la expresión de estas proteínas. En el disco imaginal de ala, la expresión temprana de Lines en el epitelio imaginal restringiría la expresión de la proteína Bowl a las células de la membrana peripodial, a su vez, Bowl regularía la expresión de Drm, Odd y Sob en estas células. La presencia de estas tres proteínas en las células de la membrana peripodial aseguraría la estabilidad de Bowl reprimiendo a Lines a diversos niveles. Por un lado Drm relocaliza a Lines al citoplasma, pero además la expresión de Odd y Sob en estas células aseguraría que la proteína residual Lines en el núcleo, no pudiera interaccionar con Bowl. Este mecanismo explica porqué la sobreexpresión de Lines en la membrana peripodial no tiene ningún efecto fenotípico.

Esta regulación genera una expresión complementaria de Lines en las células del disco propio y de Bowl en las células de la membrana peripodial que impide la función de Lines y genera una polaridad entre ambos epitelios necesaria para el correcto desarrollo del mismo ya que como hemos mostrado, la falta de Lines o la expresión de Bowl en las células del disco propio resulta en alteraciones en la identidad celular, en el crecimiento del disco y en la desregulación de las vías que intervienen durante la formación de patrón del disco.

### **8.-Divergencia funcional entre las proteínas de la familia Odd-Skipped.**

A pesar de que los patrones de expresión de Drm, Odd y Sob en los discos imaginales de ala, pata y ojo-antena son idénticos, hemos mostrado que existen diferencias funcionales entre ellos que varían según el disco considerado. Aunque las tres proteínas son capaces de estabilizar Bowl, a diferencia de Drm, Odd y Sob no cambian localización subcelular de Lines. Sin embargo, los fenotipos debidos a la expresión ectópica de Drm y Odd son semejantes. Por el contrario los fenotipos de Sob son diferentes a los de Drm y Odd, mostrando un efecto menor en la proliferación y unos cambios de identidad celular más débil. Esta diferencia podría deberse a una función divergente de Sob como ocurre en vertebrados durante la especificación

de las células del pericardio o en ciertas células de la cabeza (Hart et al., 1996).

El análisis detallado de la secuencia de estos genes revela variaciones que pueden explicar las diferencias funcionales entre ellos. Mientras que Odd, al igual que Bowl, tiene en la región C-terminal un motivo eh-1, de unión al co-represor Gro, Sob carece de dicho motivo (Goldstein et al., 2005; Hart et al., 1996). La presencia del motivo eh-1 compromete la función de Bowl y Odd de actuar como represores transcripcionales. La ausencia de este motivo en las proteínas Drm y Sob explicaría porqué las funciones son diferentes. En este contexto se ha postulado que, si bien Drm es capaz de impedir la unión de Lines a Bowl y así favorecer la formación del complejo represor Bowl-Gro, Sob es capaz de formar complejos con Odd para impedir la unión de Odd a Gro (Goldstein et al., 2005).

Los homodímeros Odd-Odd podrían formar complejos represores con Gro, de forma similar a como lo hace Bowl (Goldstein et al., 2005; Tena et al., 2007). Este modelo explicaría porqué los experimentos de GDF de Odd en los discos imaginales de pata y de ojo-antena son capaces de reproducir los fenotipos descritos para la sobreexpresión de Bowl. Un incremento en la cantidad de Sob favorecería la formación de los heterodímeros Sob-Odd, impidiendo la unión de Odd a Gro y por tanto disminuyendo la capacidad represora. Este mecanismo explica las diferencias observadas en los experimentos de GDF de Sob en el disco de ojo-antena, en el que no sólo no se reprime la expresión de Bab, sino que parece aumentar sus niveles, actuando como un activador.

Por tanto, dependiendo del contexto del desarrollo, las proteínas de la familia Odd-Skipped puedan funcionar como activadores o represores transcripcionales en función de los complejos proteicos de los que formen parte.

### ***9.-Gro y Hairless están implicados en el entrecruzamiento de las vías afectadas por la falta de función de lines.***

Hemos mostrado que la represión de la vía de Wg y la activación de la vía de Notch ocurren de forma simultánea y este hecho puede explicarse por la existencia de elementos reguladores comunes compartidos por ambas vías como el co-represor Gro. Durante el desarrollo embrionario, Bowl actúa como un represor a través del complejo formado con Gro (Goldstein et al., 2005). Nuestros resultados indican que durante el desarrollo del ala, existe un mecanismo de regulación similar, ya que muchos de los efectos observados en los clones *lin<sup>G1</sup>* o de GDF de Drm pueden ser explicados tanto porque Bowl actúa directamente como un co-represor junto con Gro (reprimiendo la vía de Wg) como por el secuestro de Gro de otros complejos represores (activando la vía de Notch).

La sustitución del motivo eh-1 por el motivo VP16 transforma a Bowl en un activador de las dianas de Wg, sugiriendo que normalmente es un represor en esta vía.

En la vía canónica de Wg, Gro se une a dTcf impidiendo la activación de la vía (Cavallo et al., 1998). El hecho de que la sobreexpresión de dTcf en clones MARCM, no sea suficiente

para rescatar los fenotipos *lin<sup>G1</sup>* de represión de la vía de Wg, sugiere que Bowl coopera junto con Gro en la represión de la vía de Wg.

En la vía de Notch, la interacción de Bowl con Gro podría secuestrar a Gro impidiendo que Gro formase parte del complejo represor Hairless/Gro/CtBP/Su(H), lo que explicaría la activación de la vía de Notch. La forma Bowl  $\Delta^{eh-1}$ -VP16, que carece del motivo de unión a Gro, es incapaz de activar la vía de Notch, sugiriendo que además Bowl no es capaz de unirse directamente a las secuencias reguladoras de los genes diana de Notch.

Un resultado sorprendente es que la expresión de Hairless es capaz de suprimir todos los efectos causados por la activación ectópica de Drm o Bowl. Esta observación favorece el modelo propuesto anteriormente, en el que la unión de Bowl a Gro impide que este forme parte del complejo Hairless/Gro/CtBP/Su(H); y además implica una competición entre Hairless y Bowl por la unión a Gro. De manera que, un incremento en la cantidad de Hairless favorecería la formación del complejo Hairless-Gro, permitiendo la represión de Notch y reduciendo la represión de la actividad de Wg. Sin embargo, este modelo no es suficiente para explicar todos los fenotipos observados en los clones mutantes *lines*. Hairless es capaz de impedir la relocalización de Lines al citoplasma mediada por Drm. En las células que co-expresan Hairless y Drm, Lines está aún presente en el núcleo. Sin embargo, a pesar de la presencia nuclear de Lines en las células que co-expresan Hairless y Drm, Bowl se acumula en estas células. ¿Cómo es posible que ambos efectos ocurran a la vez?

Una posible explicación sería que también Lines forme parte del complejo Hairless/CtBP/Gro reforzando la unión de Gro al mismo, e impidiendo la unión de Gro a Bowl. A favor de la hipótesis de que Lines forme parte del complejo Hairless/CtBP/Gro encontramos dos hechos:

- lines* tiene secuencias de unión a Gro, lo que abre la posibilidad de que Lines pueda interaccionar directamente con Gro.

- la sobreexpresión de Hairless no rescata todos los fenotipos de los clones *lin<sup>G1</sup>* generados entre 48-72 horas DEH, donde la proteína Lines es completamente eliminada, pero sí rescata los fenotipos de los clones dobles Hairless/Drm generados en el mismo estadio, en los cuales Lines está presente y Hairless compite con Drm por retener a Lines en el núcleo.

Aunque nuestros intentos por encontrar una interacción directa entre Lines-Hairless y Lines-Gro mediante IP han sido fallidos, sí hemos observado una fuerte interacción genética entre Lines y Gro. La combinación doble heterocigótica de los alelos *lin<sup>G1</sup>* y *gro<sup>l</sup>*, muestra fenotipos que son la suma de los fenotipos de ambos alelos en homocigosis. Este hecho unido a que la sobreexpresión de Gro tampoco es capaz de rescatar completamente los fenotipos de falta total de *lines* en los clones *lin<sup>G1</sup>* generados entre 48-72 horas, sugiere que Lines además de la interacción indirecta con el complejo Hairless/Gro a través de la represión de Bowl podría formar parte de este complejo.



De los resultados presentados en esta tesis podemos proponer el siguiente modelo para la función de *lines* durante el desarrollo imaginal del ala. En un primer nivel Lines estaría reprimiendo la expresión de Bowl en el epitelio del disco y restringiendo su expresión a las células de la membrana peripodial, manteniendo después dicha represión durante el resto del desarrollo imaginal del disco de ala de modo que esta polarización de las células del disco imaginal asegura el correcto desarrollo del ala. La presencia de Bowl en las células del epitelio imaginal favorece la interacción con el co-represor Gro produciendo un desequilibrio en las vías Notch, Wg y posiblemente también en las vías de Dpp y Hh (datos obtenidos por la Dr. I. Guerrero no mostrados en esta tesis), moduladas por dicho represor. Como consecuencia de dicha desregulación las células cambian su identidad celular y la capacidad de proliferación con respecto a las células silvestres. Similar a lo que ocurre en la formación de tumores, las células mutantes *lines* muestran cambios en el tamaño celular, en las propiedades de adhesión y en el nivel de proliferación.

Además de regular el estado de acumulación nuclear de Bowl, Lines podría tener un papel activo como factor modular en la regulación de los complejos de Notch y Wg, durante el desarrollo imaginal.

La búsqueda en las bases de datos de proteínas que interaccionan directamente con Lines ha dado como resultado, además de Drm y Bowl, dos nuevas proteínas: Twins (Tws) y otra aún no caracterizada que corresponde al clon de ADNcomplementario CG7386.

Se ha descrito que Tws promueve la estabilización de Arm funcionando como un regulador positivo de la vía de Wg/Wnt (Bajpai et al., 2004). El hecho de que Lines interaccione físicamente con la proteína Tws en ensayos de doble híbrido en levaduras, favorece la idea de que Lines puede ser un regulador directo de la vía de Wg, y podría contribuir en la estabilización de Arm, formando parte del complejo Arm-Tws.

La otra proteína que interacciona directamente con Lines, es la codificada por el clon CG7386 que es un factor de transcripción con dominios “dedos de Zinc” del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> igual que las proteínas de la familia Odd-Skipped. La expresión de CG7386 mediante hibridación *in situ* muestra que se expresa a lo largo del desarrollo embrionario y en los discos imaginales. Hemos visto que en el embrión tiene un patrón segmental igual que la familia de genes *odd-skipped*. Su expresión en los discos imaginales sugiere una función relacionada con la vía de Notch, ya que se expresa en las zonas donde la vía de Notch está activa como son las células del borde D/V del disco de ala, y en anillos concéntricos en los discos de pata y ojo-antena. Una posibilidad es que esta proteína interaccione con Lines formando parte del complejo regulador H/Gro/CtBP.

### ***10.-Función de lines en los discos imaginales ventrales***

En los discos imaginales ventrales como son los de pata y ojo antena, la activación de Bowl depende de Notch y se expresa en las regiones donde la vía de Notch está activa.

En el disco imaginal de pata, la activación de Notch se requiere para la formación de bordes entre los segmentos que van a dar lugar a las articulaciones de la pata adulta. En estas mismas células Notch regula la transcripción de Bowl, que a su vez regula a Odd y probablemente a Drm y Sob. La expresión de todos estos genes en las células del borde entre segmentos hace que Lines se localice en el citoplásmica. Esta localización nos hace plantearnos la siguiente pregunta: *¿Cuál sería la función de lines en los discos ventrales?*

Podría ser que Lines, al igual que ocurre en el disco imaginal de ala, se requiriese tempranamente para restringir la expresión de estos genes en la membrana peripodial. Más tarde, cuando la activación de Notch tiene lugar en los borde de segmentos durante el tercer estadio larvario, la activación de Bowl junto con los otros genes de la familia Odd-Skipped reprimiría la función de *lines* desplazando la proteína al citoplasma. Es posible que hasta ese momento Lines se exprese de manera ubicua, de modo que la falta de función de Lines en las células del epitelio antes del tercer estadio larvario, podría afectar a algunas de las vías de señalización implicadas en el desarrollo de estos discos imaginales como la vía de Wg o la de Dpp, que determinan el patrón morfogénico y el crecimiento a lo largo del eje P/D.

Por tanto, hemos demostrado que el gen *lines* tiene una función importante durante el desarrollo imaginal como parte de la red génica Drm/Lines/Bowl en la que hemos incluido otros dos miembros de la familia Odd-Skipped como son Odd y Sob. Estas dos proteínas, al igual que Drm, actúan favoreciendo la acumulación nuclear de Bowl en las células que expresan Lines. El análisis de diferentes marcadores moleculares ha mostrado que *lines* regula diferentes vías de señalización durante el desarrollo imaginal lo que nos lleva a proponer que Lines es un factor central en la integración de múltiples señales para dar una respuesta celular durante el desarrollo. La existencia de genes homólogos a *lines* y a la familia *odd-skipped* en vertebrados, como son *ors1* y *ors2* y su participación en la formación y especificación de diferentes estructuras, en procesos similares a los aquí descritos en *Drosophila* abre la posibilidad de que el mecanismo de acción esté conservado evolutivamente operando de modo similar en otros organismos.

Conclusiones

1.-La función del gen *lines* es necesaria durante el desarrollo imaginal para la correcta formación de las estructuras cuticulares adultas. En el ala, el requerimiento de la función de *lines* varía de manera dinámica a lo largo del desarrollo del disco.

2.-Los fenotipos causados por la falta de *lines*, indican cambios en las vías de Wg, Notch, Dpp, EGF-R y Jak/STAT y revelan que la función de *lines* es fundamental en la regulación de las respuestas a diferentes vías de señalización durante el desarrollo imaginal. La desregulación de estas vías de señalización tiene como consecuencia un cambio en la identidad P/D y efectos sobre la proliferación de las mismas.

3.-En el disco imaginal de ala, se conserva la jerarquía reguladora descrita en el embrión Drm/Lines/Bowl. Lines impide la acumulación nuclear de Bowl. Drm bloquea la función de Lines mediante su relocalización al citoplasma permitiendo de este modo la acumulación de Bowl. Nuestros datos sugieren que Bowl es el efector final de esta vía y puede regular la expresión de sus parálogos, los genes de la familia *odd-skipped* (*drm*, *odd* y *sob*) en las células donde se expresa.

4.-Odd y Sob, los otros dos miembros de la familia *odd-skipped*, forman parte de la vía Drm/Lines/Bowl y favorecen la acumulación de Bowl en el núcleo impidiendo la función de Lines. A diferencia de lo observado con Drm, Odd y Sob no relocalizan Lines al citoplasma, pero su capacidad para interactuar con Bowl sugiere la formación de complejos proteicos que impiden la represión mediada por Lines.

5.-A pesar de la homología existente entre los motivos de “dedos de zinc” de los miembros de la familia *odd-skipped*, hemos observado que existen divergencias funcionales entre estas proteínas.

6.-En esta red génica Drm/Lines/Bowl, *lines* está implicado en el desarrollo imaginal del ala restringiendo la expresión de Bowl a las células de la membrana peripodial. La acumulación nuclear de Bowl en las células del disco propio es la responsable principal de los efectos fenotípicos observados en la falta de *lines*. *lines*, es un regulador del mantenimiento del borde D/V, actuando como un modulador entre las vías de señalización de Notch y de Wg a través de la represión de Bowl.

7.-Bowl interactúa con el co-represor Gro a través del dominio eh-1. La presencia de Bowl en las células del epitelio del disco propio permite el secuestro de Gro del complejo represor de la vía de Notch, y lo recluta hacia otros complejos represores como el de la vía de Wg donde Bowl tiene capacidad de actuar como un represor transcripcional.

8.-Hairless compete con Drm por la unión a Lines impidiendo que Drm ejerza su función. Por lo tanto, no podemos descartar la participación de Lines en el complejo Hairless/Gro/CtBP apoyada por los fenotipos observados en los individuos adultos dobles heterocigóticos *lin<sup>G1</sup>* y *gro<sup>1</sup>*.





## Bibliografía

- Adachi-Yamada, T.** (2002). Puckered-GAL4 driving in JNK-active cells. *Genesis* **34**, 19-22.
- Aldaz, S., Morata, G. and Azpiazu, N.** (2005). Patterning function of homothorax/extradenticle in the thorax of *Drosophila*. *Development* **132**, 439-46.
- Amoyel, M., Cheng, Y. C., Jiang, Y. J. and Wilkinson, D. G.** (2005). Wnt1 regulates neurogenesis and mediates lateral inhibition of boundary cell specification in the zebrafish hindbrain. *Development* **132**, 775-85.
- Angerer, L. M. and Angerer, R. C.** (2003). Patterning the sea urchin embryo: gene regulatory networks, signaling pathways, and cellular interactions. *Curr Top Dev Biol* **53**, 159-98.
- Apidianakis, Y., Grbavec, D., Stifani, S. and Delidakis, C.** (2001). Groucho mediates a Ci-independent mechanism of hedgehog repression in the anterior wing pouch. *Development* **128**, 4361-70.
- Ashburner, M. and Gubb, D.** (1989). Chaotic names. *Nature* **339**, 264.
- Aulehla, A. and Herrmann, B. G.** (2004). Segmentation in vertebrates: clock and gradient finally joined. *Genes Dev* **18**, 2060-7.
- Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B. and Herrmann, B. G.** (2003). Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev Cell* **4**, 395-406.
- Baena-Lopez, L. A., Pastor-Pareja, J. C. and Resino, J.** (2003). Wg and Egfr signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in *Drosophila* wing discs. *Development* **130**, 6497-506.
- Bajpai, R., Makhijani, K., Rao, P. R. and Shashidhara, L. S.** (2004). *Drosophila* Twins regulates Armadillo levels in response to Wg/Wnt signal. *Development* **131**, 1007-16.
- Baonza, A., Roch, F. and Martin-Blanco, E.** (2000). DER signaling restricts the boundaries of the wing field during *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7331-5.
- Barolo, S., Stone, T., Bang, A. G. and Posakony, J. W.** (2002). Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev* **16**, 1964-76.
- Barrio, R., de Celis, J. F., Bolshakov, S. and Kafatos, F. C.** (1999). Identification of regulatory regions driving the expression of the *Drosophila* spalt complex at different developmental stages. *Dev Biol* **215**, 33-47.
- Binari, R. and Perrimon, N.** (1994). Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev* **8**, 300-12.
- Bishop, S. A., Klein, T., Arias, A. M. and Couso, J. P.** (1999). Composite signalling from Serrate and Delta establishes leg segments in *Drosophila* through Notch. *Development* **126**, 2993-3003.
- Blackman, R. K., Sanicola, M., Raftery, L. A., Gillevet, T. and Gelbart, W. M.** (1991). An extensive 3' cis-regulatory region directs the imaginal disk expression of decapentaplegic, a member of the TGF-beta family in *Drosophila*. *Development* **111**, 657-66.
- Blair, S. S.** (2003). Lineage compartments in *Drosophila*. *Curr Biol* **13**, R548-51.
- Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B. and Zavortink, M.** (1994). The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development* **120**, 1805-15.
- Bokor, P. and DiNardo, S.** (1996). The roles of hedgehog, wingless and lines in patterning the dorsal epidermis in *Drosophila*. *Development* **122**, 1083-92.
- Bosch, M., Serras, F., Martin-Blanco, E. and Baguna, J.** (2005). JNK signaling pathway

required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* **280**, 73-86.

**Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.

**Bras-Pereira, C., Bessa, J. and Casares, F.** (2006). Odd-skipped genes specify the signaling center that triggers retinogenesis in *Drosophila*. *Development* **133**, 4145-9.

**Bray, S. J.** (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 678-89.

**Brown, S., Hu, N. and Hombria, J. C.** (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr Biol* **11**, 1700-5.

**Buceta, J., Herranz, H., Canela-Xandri, O., Reigada, R., Sagues, F. and Milan, M.** (2007). Robustness and stability of the gene regulatory network involved in DV boundary formation in the *Drosophila* wing. *PLoS ONE* **2**, e602.

**Buscarlet, M. and Stifani, S.** (2007). The 'Marx' of Groucho on development and disease. *Trends Cell Biol* **17**, 353-61.

**Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-5.

**Capdevila, J. and Guerrero, I.** (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *Embo J* **13**, 4459-68.

**Castelli-Gair, J.** (1998). The *lines* gene of *Drosophila* is required for specific functions of the Abdominal-B HOX protein. *Development* **125**, 1269-74.

**Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Peifer, M. and Bejsovec, A.** (1998). *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**, 604-8.

**Cohen, S. M., Bronner, G., Kuttner, F., Jurgens, G. and Jackle, H.** (1989). Distal-less encodes a homeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* **338**, 432-4.

**Cheng, Y. C., Amoyel, M., Qiu, X., Jiang, Y. J., Xu, Q. and Wilkinson, D. G.** (2004). Notch activation regulates the segregation and differentiation of rhombomere boundary cells in the zebrafish hindbrain. *Dev Cell* **6**, 539-50.

**Dahmann, C. and Basler, K.** (1999). Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends Genet* **15**, 320-6.

**Darnell, J. E., Jr.** (1997). STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-5.

**DasGupta, R., Boutros, M. and Perrimon, N.** (2005). *Drosophila* Wnt/Fz pathways. *Sci STKE* **2005**, cm5.

**de Celis Ibeas, J. M. and Bray, S. J.** (2003). Bowl is required downstream of Notch for elaboration of distal limb patterning. *Development* **130**, 5943-52.

**de Celis, J. F. and Bray, S.** (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 3241-51.

**de Celis, J. F., Bray, S. and Garcia-Bellido, A.** (1997). Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 1919-28.

**de Celis, J. F., Garcia-Bellido, A. and Bray, S. J.** (1996). Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* **122**, 359-69.

**de Celis, J. F., Tyler, D. M., de Celis, J. and Bray, S. J.** (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* **125**, 4617-26.

**De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S.,**

- Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J. et al.** (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518-22.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-52.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 4215-25.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., JL, G. m.-S., Cavodeassi, F. and Modolell, J.** (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev* **13**, 1754-61.
- Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev* **10**, 421-34.
- Eaton, S. and Kornberg, T. B.** (1990). Repression of ci-D in posterior compartments of *Drosophila* by engrailed. *Genes Dev* **4**, 1068-77.
- Estrach, S., Ambler, C. A., Lo Celso, C., Hozumi, K. and Watt, F. M.** (2006). Jagged 1 is a beta-catenin target gene required for ectopic hair follicle formation in adult epidermis. *Development* **133**, 4427-38.
- Fleming, R. J., Gu, Y. and Hukriede, N. A.** (1997). Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **124**, 2973-81.
- Furriols, M. and Bray, S.** (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Curr Biol* **11**, 60-4.
- Gallet, A., Erkner, A., Charroux, B., Fasano, L. and Kerridge, S.** (1998). Trunk-specific modulation of wingless signalling in *Drosophila* by teashirt binding to armadillo. *Curr Biol* **8**, 893-902.
- Garcia-Bellido, A.** (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found Symp* **0**, 161-82.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* **245**, 251-3.
- Gibson, M. C. and Perrimon, N.** (2005). Extrusion and death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing. *Science* **307**, 1785-9.
- Giraldez, A. J. and Cohen, S. M.** (2003). Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development. *Development* **130**, 6533-43.
- Godt, D., Couderc, J. L., Cramton, S. E. and Laski, F. A.** (1993). Pattern formation in the limbs of *Drosophila*: bric a brac is expressed in both a gradient and a wave-like pattern and is required for specification and proper segmentation of the tarsus. *Development* **119**, 799-812.
- Goldstein, R. E., Cook, O., Dinur, T., Pisante, A., Karandikar, U. C., Bidwai, A. and Paroush, Z.** (2005). An eh1-like motif in odd-skipped mediates recruitment of Groucho and repression in vivo. *Mol Cell Biol* **25**, 10711-20.
- Golic, K. G.** (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* **252**, 958-61.
- Green, R. B., Hatini, V., Johansen, K. A., Liu, X. J. and Lengyel, J. A.** (2002). Drumstick is a zinc finger protein that antagonizes Lines to control patterning and morphogenesis of the *Drosophila* hindgut. *Development* **129**, 3645-56.
- Guillen, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sanchez-Herrero, E., Morata, G. and Guerrero, I.**

(1995). The function of engrailed and the specification of Drosophila wing pattern. *Development* **121**, 3447-56.

**Hao, I., Green, R. B., Dunaevsky, O., Lengyel, J. A. and Rauskolb, C.** (2003). The odd-skipped family of zinc finger genes promotes Drosophila leg segmentation. *Dev Biol* **263**, 282-95.

**Harrison, D. A., McCoon, P. E., Binari, R., Gilman, M. and Perrimon, N.** (1998). Drosophila unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev* **12**, 3252-63.

**Hart, M. C., Wang, L. and Coulter, D. E.** (1996). Comparison of the structure and expression of odd-skipped and two related genes that encode a new family of zinc finger proteins in Drosophila. *Genetics* **144**, 171-82.

**Hasson, P., Egoz, N., Winkler, C., Volohonsky, G., Jia, S., Dinur, T., Volk, T., Courey, A. J. and Paroush, Z.** (2005). EGFR signaling attenuates Groucho-dependent repression to antagonize Notch transcriptional output. *Nat Genet* **37**, 101-5.

**Hasson, P., Muller, B., Basler, K. and Paroush, Z.** (2001). Brinker requires two corepressors for maximal and versatile repression in Dpp signalling. *Embo J* **20**, 5725-36.

**Hasson, P. and Paroush, Z.** (2006). Crosstalk between the EGFR and other signalling pathways at the level of the global transcriptional corepressor Groucho/TLE. *Br J Cancer* **94**, 771-5.

**Hatini, V., Bokor, P., Goto-Mandeville, R. and DiNardo, S.** (2000). Tissue- and stage-specific modulation of Wingless signaling by the segment polarity gene lines. *Genes Dev* **14**, 1364-76.

**Hatini, V., Green, R. B., Lengyel, J. A., Bray, S. J. and Dinardo, S.** (2005). The Drumstick/ Lines/Bowl regulatory pathway links antagonistic Hedgehog and Wingless signaling inputs to epidermal cell differentiation. *Genes Dev* **19**, 709-18.

**Irvine, K. D. and Rauskolb, C.** (2001). Boundaries in development: formation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 189-214.

**Irvine, K. D. and Wieschaus, E.** (1994). fringe, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during Drosophila wing development. *Cell* **79**, 595-606.

**Iwaki, D. D., Johansen, K. A., Singer, J. B. and Lengyel, J. A.** (2001). drumstick, bowl, and lines are required for patterning and cell rearrangement in the Drosophila embryonic hindgut. *Dev Biol* **240**, 611-26.

**Jacobson, M. D., Weil, M. and Raff, M. C.** (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-54.

**Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R. and Israel, A.** (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355-8.

**Johansen, K. A., Green, R. B., Iwaki, D. D., Hernandez, J. B. and Lengyel, J. A.** (2003). The Drm-Bowl-Lin relief-of-repression hierarchy controls fore- and hindgut patterning and morphogenesis. *Mech Dev* **120**, 1139-51.

**Kai, T. and Spradling, A.** (2003). An empty Drosophila stem cell niche reactivates the proliferation of ectopic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4633-8.

**Kim, J., Sebring, A., Esch, J. J., Kraus, M. E., Vorwerk, K., Magee, J. and Carroll, S. B.** (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by Drosophila vestigial gene. *Nature* **382**, 133-8.

**Klein, T. and Arias, A. M.** (1998). Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless, and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in Drosophila.



*Dev Biol* **194**, 196-212.

**Klein, T. and Arias, A. M.** (1999). The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in *Drosophila*. *Development* **126**, 913-25.

**Klein, T., Seugnet, L., Haenlin, M. and Martinez Arias, A.** (2000). Two different activities of Suppressor of Hairless during wing development in *Drosophila*. *Development* **127**, 3553-66.

**Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. and Simon, M.** (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* **40**, 45-53.

**Lawrence, N., Dearden, P., Hartley, D., Roose, J., Clevers, H. and Arias, A. M.** (2000). dTcf antagonises Wingless signalling during the development and patterning of the wing in *Drosophila*. *Int J Dev Biol* **44**, 749-56.

**Lawrence, P. A. and Morata, G.** (1992). Developmental biology. Lighting up *Drosophila*. *Nature* **356**, 107-8.

**Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M.** (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387-93.

**Lecuit, T. and Cohen, S. M.** (1997). Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature* **388**, 139-45.

**Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L. and Paro, R.** (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* **438**, 234-7.

**Lee, T. and Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.

**Lengyel, J. A. and Iwaki, D. D.** (2002). It takes guts: the *Drosophila* hindgut as a model system for organogenesis. *Dev Biol* **243**, 1-19.

**Logan, C. Y. and Nusse, R.** (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810.

**Mann, R. S. and Morata, G.** (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 243-71.

**Mardon, G., Solomon, N. M. and Rubin, G. M.** (1994). dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **120**, 3473-86.

**Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. and Martinez-Arias, A.** (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 557-70.

**Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. and Garcia-Bellido, A.** (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7888-93.

**Martin-Blanco, E., Roch, F., Noll, E., Baonza, A., Duffy, J. B. and Perrimon, N.** (1999). A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **126**, 5739-47.

**Maves, L. and Schubiger, G.** (2003). Transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: a model for understanding pluripotency and selector gene maintenance. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 472-9.

**McClay, D. R., Peterson, R. E., Range, R. C., Winter-Vann, A. M. and Ferkowicz, M. J.** (2000). A micromere induction signal is activated by beta-catenin and acts through notch to initiate specification of secondary mesenchyme cells in the sea urchin embryo. *Development* **105**

127, 5113-22.

**Methot, N. and Basler, K.** (1999). Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of *Cubitus interruptus*. *Cell* **96**, 819-31.

**Micchelli, C. A., Rulifson, E. J. and Blair, S. S.** (1997). The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* **124**, 1485-95.

**Milan, M. and Cohen, S. M.** (2000). Temporal regulation of apterous activity during development of the *Drosophila* wing. *Development* **127**, 3069-78.

**Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D. and Moon, R. T.** (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. *Oncogene* **18**, 7860-72.

**Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H. and Tabata, T.** (1999). brinker is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* **398**, 242-6.

**Moghal, N. and Sternberg, P. W.** (1999). Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 190-6.

**Morata, G. and Lawrence, P. A.** (1975). Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*. *Nature* **255**, 614-7.

**Morata, G. and Sanchez-Herrero, E.** (1999). Patterning mechanisms in the body trunk and the appendages of *Drosophila*. *Development* **126**, 2823-8.

**Morel, V., Lecourtois, M., Massiani, O., Maier, D., Preiss, A. and Schweisguth, F.** (2001). Transcriptional repression by suppressor of hairless involves the binding of a hairless-dCtBP complex in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**, 789-92.

**Moreno, E., Basler, K. and Morata, G.** (2002). Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* **416**, 755-9.

**Mukherjee, T., Hombria, J. C. and Zeidler, M. P.** (2005). Opposing roles for *Drosophila* JAK/STAT signalling during cellular proliferation. *Oncogene* **24**, 2503-11.

**Mullor, J. L., Calleja, M., Capdevila, J. and Guerrero, I.** (1997). Hedgehog activity, independent of decapentaplegic, participates in wing disc patterning. *Development* **124**, 1227-37.

**Musacchio, M. and Perrimon, N.** (1996). The *Drosophila* kekkon genes: novel members of both the leucine-rich repeat and immunoglobulin superfamilies expressed in the CNS. *Dev Biol* **178**, 63-76.

**Nagel, A. C., Krejci, A., Tenin, G., Bravo-Patino, A., Bray, S., Maier, D. and Preiss, A.** (2005). Hairless-mediated repression of notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors. *Mol Cell Biol* **25**, 10433-41.

**Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K.** (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-68.

**Nolo, R., Abbott, L. A. and Bellen, H. J.** (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* **102**, 349-62.

**Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.

**Pai, L. M., Orsulic, S., Bejsovec, A. and Peifer, M.** (1997). Negative regulation of Armadillo, a Wingless effector in *Drosophila*. *Development* **124**, 2255-66.

**Pallavi, S. K. and Shashidhara, L. S.** (2003). Egfr/Ras pathway mediates interactions between peripodial and disc proper cells in *Drosophila* wing discs. *Development* **130**, 4931-41.

**Panganiban, G., Irvine, S. M., Lowe, C., Roehl, H., Corley, L. S., Sherbon, B., Grenier,**

- J. K., Fallon, J. F., Kimble, J., Walker, M. et al.** (1997). The origin and evolution of animal appendages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5162-6.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K. D.** (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-12.
- Pourquie, O.** (2003). Vertebrate somitogenesis: a novel paradigm for animal segmentation? *Int J Dev Biol* **47**, 597-603.
- Preiss, A., Hartley, D. A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1988). The molecular genetics of Enhancer of split, a gene required for embryonic neural development in *Drosophila*. *Embo J* **7**, 3917-27.
- Rauskolb, C. and Irvine, K. D.** (1999). Notch-mediated segmentation and growth control of the *Drosophila* leg. *Dev Biol* **210**, 339-50.
- Rodbell, M.** (1995). Signal transduction: evolution of an idea. *Environ Health Perspect* **103**, 338-45.
- Saulier-Le Drean, B., Nasiadka, A., Dong, J. and Krause, H. M.** (1998). Dynamic changes in the functions of Odd-skipped during early *Drosophila* embryogenesis. *Development* **125**, 4851-61.
- Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A. and Kopan, R.** (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **393**, 382-6.
- Shen, J. and Dahmann, C.** (2005). Extrusion of cells with inappropriate Dpp signaling from *Drosophila* wing disc epithelia. *Science* **307**, 1789-90.
- Sherwood, D. R. and McClay, D. R.** (2001). LvNotch signaling plays a dual role in regulating the position of the ectoderm-endoderm boundary in the sea urchin embryo. *Development* **128**, 2221-32.
- Spradling, A. C. and Rubin, G. M.** (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-7.
- Struhl, G. and Adachi, A.** (1998). Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* **93**, 649-60.
- Struhl, G. and Greenwald, I.** (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* **398**, 522-5.
- Sweet, H. C., Gehring, M. and Etensohn, C. A.** (2002). LvDelta is a mesoderm-inducing signal in the sea urchin embryo and can endow blastomeres with organizer-like properties. *Development* **129**, 1945-55.
- Tabata, T., Eaton, S. and Kornberg, T. B.** (1992). The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev* **6**, 2635-45.
- Tabata, T. and Takei, Y.** (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* **131**, 703-12.
- Tautz, D. and Pfeifle, C.** (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-5.
- Tena, J. J., Neto, A., de la Calle-Mustienes, E., Bras-Pereira, C., Casares, F. and Gomez-Skarmeta, J. L.** (2007). Odd-skipped genes encode repressors that control kidney development. *Dev Biol* **301**, 518-31.
- Tolwinski, N. S. and Wieschaus, E.** (2004). A nuclear escort for beta-catenin. *Nat Cell Biol* **6**, 579-80.
- Vachon, G., Cohen, B., Pfeifle, C., McGuffin, M. E., Botas, J. and Cohen, S. M.** (1992). Homeotic genes of the Bithorax complex repress limb development in the abdomen of the

Drosophila embryo through the target gene Distal-less. *Cell* **71**, 437-50.

**van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A. et al.** (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell* **88**, 789-99.

**Wang, L. and Coulter, D. E.** (1996). bowel, an odd-skipped homolog, functions in the terminal pathway during Drosophila embryogenesis. *Embo J* **15**, 3182-96.

**Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G.** (2000). Dual role for Drosophila epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev* **14**, 2271-6.

**Whitworth, A. J. and Russell, S.** (2003). Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the Drosophila wing. *Dev Biol* **254**, 277-88.

**Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* **117**, 1223-37.

**Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C. R. and Darnell, J. E., Jr.** (1996). Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development. *Cell* **84**, 421-30.

**Yeo, S. L., Lloyd, A., Kozak, K., Dinh, A., Dick, T., Yang, X., Sakonju, S. and Chia, W.** (1995). On the functional overlap between two Drosophila POU homeo domain genes and the cell fate specification of a CNS neural precursor. *Genes Dev* **9**, 1223-36.

**Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the Drosophila wing. *Development* **121**, 2265-78.

**Zecca, M. and Struhl, G.** (2002a). Control of growth and patterning of the Drosophila wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1369-76.

**Zecca, M. and Struhl, G.** (2002b). Subdivision of the Drosophila wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-68.

**Zecca, M. and Struhl, G.** (2007). Recruitment of cells into the Drosophila wing primordium by a feed-forward circuit of vestigial autoregulation. *Development* **134**, 3001-10.

**Zeidler, M. P., Bach, E. A. and Perrimon, N.** (2000). The roles of the Drosophila JAK/STAT pathway. *Oncogene* **19**, 2598-606.